

02 01. 2006

(79)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 NOV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

ur vous informer : INPI DIRECT

Numéro 0 825 83 85 87

0,15 € TTC, mn

écopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

EMISE DES PIÈCES
ATE

IEU

27 OCT 2004

75 INPI PARIS B

1^{er} D'ENREGISTREMENT

ATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0411480

ATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

AR L'INPI

27 OCT. 2004

los références pour ce dossier

(facultatif) 241699 D22707 NT

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*04

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/4

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 9 W / 191203

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Identification d'une mutation de JAK2 impliqué dans la Polyglobulie de Vaquez

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale ☐ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

ETABLISSEMENT PUBLIC DE SANTE

26750045200011

3, avenue Victoria, 75004 PARIS FRANCE

Domicile

Rue

ou

siège

Code postal et ville

Pays

Nationalité

FRANCE
Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

BEST AVAILABLE COPY

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

27 OCT 2004

75 INPI PARIS B

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0411480

DB 540 W / 191203

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom Prénom Cabinet ou Société Nationalité N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		241699 D22707NT Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI



bis, rue de Saint Pétersbourg

100 Paris Cedex 08

phone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° ... 2 / ... 4

SUITE

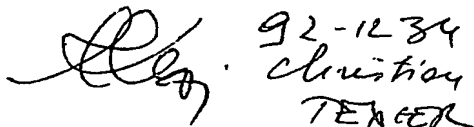
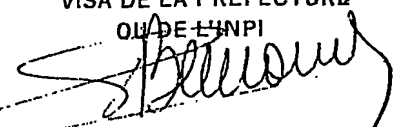
Reserve a l'INPI

EMISE DES PIÈCES
DATE 27 OCT 2004
EU 75 INPI PARIS B
0411480

D'ENREGISTREMENT
ATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 140301

os références pour ce dossier (facultatif)		241699 D22707 NT
1 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
1 DEMANDEUR		
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
Prénoms		
Forme juridique		ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET
N° SIREN		TECHNO...
Code APE-NAF		180036048
Adresse	Rue	101, rue de Tolbiac 75013 PARIS FRANCE
	Code postal et ville	
	Pays	
Nationalité		FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		Française
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
1 DEMANDEUR		
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		
Code APE-NAF		ETABLISSEMENT D'UTILITE PUBLIQUE
Adresse	Rue	77574110100031 39, rue Camille Desmoulins 94800 VILLEJUIF FRANCE
	Code postal et ville	
	Pays	
Nationalité		FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		Française
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
1 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
 92-1234 Christian Tenger		

n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.

... les documents concernant auprès de l'INPI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° ... / ...
3 4

BR/SUITE

REMISE DES PIÈCES
DATE

LIEU

27 OCT 2004

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0411480

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 824 # W / 191203

Vos références pour ce dossier (facultatif)

241699 D22707 NT

☒ **DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom
ou dénomination sociale

UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

23 rue du refuge, 78035 VERSAILLES FRANCE

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ **DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)**

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom
ou dénomination sociale

UNIVERSITE PARIS-SUD

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

19911101400015

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

**ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE, CULTUREL, PRO..**

Code postal et ville

Pays

Bâtiment 300

15, rue Georges Clémenceau, 91400 ORSAY FRANCE

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

FRANCE

Française

☒ **SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

*Christian
TEXIER*
92-1234

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

Benjamin

- 5 La présente invention concerne le variant V617F de la protéine tyrosine kinase JAK2, ledit variant étant responsable de la Polyglobulie de Vaquez. L'invention se rapporte également à une méthode de diagnostic des syndromes myéloprolifératifs impliquant le variant JAK2 V617F et à l'identification d'inhibiteurs spécifiques et de siRNA.
- 10 La polyglobulie de Vaquez (PV) est un syndrome myéloprolifératif chronique, associant une polyglobulie vraie et, souvent, une thrombocytose et une hyperleucocytose. Il s'agit d'une maladie acquise, clonale, de la cellule souche hématopoïétique. Les progéniteurs hématopoïétiques de PV sont capables de former des colonies érythroblastiques en l'absence d'érythropoïétine (Epo), appelées « colonies spontanées ». Une
- 15 hypersensibilité des progéniteurs érythroblastiques de PV à plusieurs autres facteurs de croissance a également été démontrée : Interleukine-3 (IL-3), Granulocyte Macrophage-Stimulating Factor (GM-CSF), Stem Cell Factor (SCF), et Insuline Like Growth Factor (IGF-1). Plusieurs équipes se sont intéressées à la physiopathologie de la PV, mais l'anomalie moléculaire à l'origine de la maladie est restée inconnue à ce jour (H. Pahl,
- 20 2000).

L'hypersensibilité des progéniteurs de PV à plusieurs cytokines conduit à rechercher des anomalies touchant les voies de transduction du signal communes aux récepteurs aux cytokines. L'existence d'un marqueur moléculaire n'a jamais été mise en évidence

25 dans la PV, mais étant données les similitudes entre la PV et les autres syndromes myéloprolifératifs, en particulier la LMC, il paraît probable que des mécanismes moléculaires proches de ceux induits par Bcr-Abl soient responsables de l'avantage de prolifération du clone malin et de sa différenciation terminale. Cette hypothèse a été confirmée récemment dans deux syndromes myéloprolifératifs rares, les syndromes

30 myéloprolifératifs associés à une translocation impliquant la région chromosomique 8p11 qui induit une activation constitutive du récepteur du FGF et le syndrome hyperéosinophilique, dans lequel une délétion chromosomique cryptique aboutit à un

gène chimérique PDGFR α -FIP1L1. Dans les deux cas, les anomalies moléculaires sont à l'origine de protéines de fusion ayant une activité tyrosine kinase constitutive.

Dans la PV, il n'a pas été trouvé d'anomalie cytogénétique récurrente, même si une
 5 délétion 20q est détectée chez 10 à 15% des patients, et une perte d'hétérozygotie en 9p dans environ 30% des cas (Kralovics, 2002). Cependant, ces anomalies ne sont pas spécifiques de la maladie.

Les cellules de PV présentant une indépendance à l'Epo, des recherches ont été
 10 entreprises sur la voie du récepteur de l'Epo (R-Epo). Tout d'abord, le récepteur est normal tant sur le plan structurel que fonctionnel (Hess et al., 1994; Le Couedic et al.; 1996; Means et al., 1989). La phosphatase SHP-1 qui déphosphoryle R-Epo et JAK2 à l'arrêt de la stimulation par l'Epo, est normalement exprimée au niveau ARN et protéique (Andersson et al., 1997; Asimakopoulos et al., 1997). Plus en aval dans la
 15 signalisation de R-Epo, une activation anormale de STAT5 a été recherchée dans les polynucléaires (PNN) de patients présentant une PV sans retrouver d'anomalie. En revanche, une phosphorylation constitutive de STAT3 a été mise en évidence dans les PNN de 4 cas de PV sur 14 étudiés (Roder, 2001). Enfin, l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xl, cible transcriptionnelle de STAT5, a été étudiée en
 20 immunohistochimie et en cytométrie de flux (Silva et al., 1998). Il a ainsi été montré que bcl-xl était hyperexprimée dans les érythroblastes de PV et notamment à un stade plus mature où cette protéine n'est normalement plus exprimée.

Dans la polyglobulie de Vaquez, les principaux critères diagnostiques sont à ce jour
 25 cliniques (critères du PVSG; Pearson, 2001). Le diagnostic biologique ne repose actuellement que sur la réalisation des cultures de progéniteurs érythroïdes en l'absence d'Epo (détection des colonies endogènes). En raison de l'expertise nécessaire à sa bonne réalisation, et l'importance du « temps-technicien » dépensé, cet examen n'est pas disponible dans tous les centres, et n'est fiable que lorsqu'il est réalisé par un
 30 laboratoire expérimenté. De plus, le test nécessite d'être réalisé sur cellules médullaires pour une bonne sensibilité, ce qui est n'est pas anodin pour le patient.

Par des techniques d'hybridation soustractive, une équipe allemande a cloné un gène hyperexprimé dans les PNN de PV, appelé PRV1 (Polycythemia Rubra Vera 1) (Temerinac et al., 2000). La protéine PRV-1 appartient à la superfamille des récepteurs de surface uPAR. L'hyperexpression de l'ARNm codant pour PRV-1 dans les polynucléaires de PV est facilement détectable par RT-PCR en temps réel, et constitue un marqueur de la maladie de découverte récente, sans rôle physiopathologique. Cependant, les études récemment publiées montrent qu'il n'est ni très sensible ni très spécifique.

Spivak JL et al., en 2003 (« Chronic myeloproliferative disorders. » ; Hematology ; 2003;200 24.) décrit certains marqueurs de la PV. Les mRNA de l'antigène neutrophile NBI/CD177 sont surexprimés dans les granulocytes de patients PV. Ce marqueur ne semble toutefois pas un moyen fiable de détecter les PV, certains malades ne présentant pas cette surexpression ou cette surexpression pouvant être observée sur des sujets atteints de syndromes myéloprolifératifs autres que la Polyglobulie de Vaquez. Une expression déficiente du récepteur à la thrombopoïétine, Mpl, est également retrouvée dans les syndromes myéloprolifératifs chroniques mais pas spécifiquement de PV.

Ainsi, il n'existe dans l'état de la technique aucune méthode permettant un diagnostic fiable de la PV. En outre, les seuls traitements disponibles ne sont pas spécifiques. Il s'agit de saignées pour maintenir l'hématocrite dans les limites de la normale, ou l'emploi d'agents cytotoxiques, ou encore d'IFN.

Dans le cadre de la présente invention, nous avons non seulement découvert une mutation dans le gène JAK2 dans environ 90% des patients testés mais nous avons également établi que cette mutation est responsable d'une activation constitutive de cette tyrosine kinase et démontré que son inhibition permet de bloquer la prolifération et la différenciation spontanées des érythroblastes de PV.

JAK2 appartient à la famille des Janus Kinases (JAKs), qui regroupe plusieurs tyrosine kinases intracytoplasmiques : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les protéines JAK sont impliquées dans la signalisation intracellulaire de nombreux récepteurs membranaires

qui n'ont pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, comme certains membres de la superfamille des récepteurs aux cytokines et en particulier le récepteur à l'Epo (R-Epo). La protéine JAK2 est codée par un gène qui comporte 23 exons. L'ADN complémentaire a une taille de 3500 paires de bases, et code pour une protéine de 1132 acides aminés (130 kD) (Figure 1). Nous avons identifié par PCR et séquençage une mutation ponctuelle dans l'exon 12 de JAK2 chez près de 90 % des patients atteints de PV. Le codon 617 « GTC », codant normalement une Valine (V), est muté en « TTC », codant une Phénylalanine (F). Cette mutation V617F n'est pas retrouvée chez les 25 témoins ou patients atteints de polyglobulie secondaire testés.

10

Ainsi, l'invention apporte pour la première fois un outil de diagnostic et ouvre la voie au traitement ciblé de la PV et également des syndromes myéloprolifératifs associées à cette mutation.

15 **Description de l'invention**

Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention concerne la protéine isolée JAK2 (Janus kinase 2), en particulier la protéine Homo sapiens Janus kinase 2 (NCBI accession number NM_004972 ; GI:13325062), comprenant une mutation sur l'acide aminé 617 (codon 617 de l'ADNc à compter de l'ATG), plus particulièrement la mutation V617F, ci-après dénommé variant JAK2 V617F, telle que présentée à la SEQ ID No 1 ci-dessous :

25

SEQ ID No 1 (V617F Homo sapiens Janus kinase 2 ou JAK2 V617F)

30

MGMACLTMTMEGTSTSSIQNGDISGNANSMKQIDPVLQVYLYHSLGKSEAD
YLTGPSGEYVAEEICIAASKACGITPVYHNMFALMSETERIWYPPNHVFHIDEST
RHNVLRYRIRFYFPRWYCSGSNRAYRHGISRGAEAPLLDDFVMSYLAQWRHDF
VHGWIQVPVTHETQEECLGMAVLDMMRIAKENDQTPLAIYNSISYKTFLPKCIR
AKIQDYHILTRKRIRYRFRRFIQFSQCKATARNLKLKYLINLETQLQSAFYTEKF
EVKEPGSGPSGEEIFATIIITGNGGIQWSRGKHKESETLTEQDLQLYCDFPNIIDVS
IKQANQEGSNESRVVTIHKQDGKNLEIELSSLREALSFVSLIDGYRRLTADAHY

LCKEVAPPAVLENIQSNCHGPISMDFAISKLLKAGNQGTGLYVLRCSFKDFNKYF
 LTFATERENVIEYKHCLITKNENEEYNLSGTTKNFSSLLKDLLNCYQMETVRSDN
 IIFQFTKCCPPKPKDKSNLLVVRTNGVSDVPTSPTLQRPTHMNQMVFHKIRNEDL
 IFNESLGQGTFTKIFKGVRREVVDYGGQLHETEVLLKVLDKAHRNYSSESFFEAAS
 5 MMSKLSHKHLVLNYGVCF⁶¹⁷CGDENILVQEFVKFGSLDTYLLKKNKNCINILWK
 LEVAKQLAWAMHFLEENTLIHGNVCAKNILLIREEDRKTGNPPFIKLSDFGISIT
 VLPKDILQERIPWVPPECIENPKNLNLATDKWSFGTTLWEICSGGDKPLSALDSQ
 RKLQFYEDRHQLPAPKWAELANLINNCMDYEPDFRPSFRAIIRDLNSLFTPDYE
 LLTENDMLPNMRIGALGFSGAFEDRDPTQFEERHLKFLQQLGKGNFGSVEMCR
 10 YDPLQDNTGEVVAVKKLQHSTEEHLRDFEREIEILKSLQHDNIVKYKGVCSAG
 RRNLKLIMEYLPYGSLRDYLLQKHKERIDHIKLLQYTSQICKGMEYLGTKRYIHR
 DLATRNLVENENRVKIGDFGLTKVLPQDKEYYKVKEPGESPIFWYAPESLTES
 KFSVASDVWSFGVVLYELFTYIEKSKSPPAEFMRMIGNDKQGQMIVFHLLIELLK
 NNGRLPRPDGCPDEIYMIMTECWNNNVNQRPSFRDLALRVDQIRDNMAG

15

L'invention vise également des équivalents de cette protéine mutée en position 617 chez
 d'autres mammifères, par exemple les JAK2 V617F chez d'autres mammifères tels que
 le rat (NM_031514), le porc, la souris (NM_008413),... ainsi que des variants de la
 SEQ ID No 1 qui comportent en outre une ou plusieurs modifications qui n'affectent pas
 20 l'activité et la structure 3D du variant.

L'invention porte également sur une séquence nucléotidique codant pour la SEQ ID No
 1, de préférence la SEQ ID No 2 (séquence du gène humain JAK2 avec le codon TTC
 au lieu de GTC sur le codon 617 (**mutation g/t en position 1849**, si après dénommée
 25 par G1849T, à partir de l'ATG marquant le début de la traduction).

Cette séquence peut se trouver dans un vecteur viral ou plasmidique ou encore un ADN
 nu sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules de mammifères.
 L'invention s'étend donc à un vecteur exprimant la protéine JAK2 V617F.

30 Le vecteur de l'invention peut être un vecteur de clonage et/ou d'expression et peut être
 utilisé pour transfecter une cellule hôte, notamment une cellule de mammifère, de
 préférence une lignée progénitrice CD34+ humaine.

Animal transgénique modèle de la PV et autres syndromes myéloprolifératifs

L'invention porte également sur un animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F recombinante. Cet animal peut de préférence être une souris ou un rat. Les rats
5 ou souris transgéniques servant de modèle peuvent être obtenues par toute méthode couramment utilisée par l'homme du métier, notamment un Knock-in (insertion ciblée d'une séquence) par recombinaison homologue ou recombinaison dirigée avec les système Cre-LoxP ou FLP-FRT dans des cellules ES. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule transgénique selon l'invention est obtenue par
10 ciblage génique (« gene targeting ») du variant JAK2 G1849T au niveau d'une ou des séquences du génome de la cellule hôte. Plus précisément, le transgène est inséré de manière stable par recombinaison homologue au niveau de séquences homologues dans le génome de la cellule hôte. Lorsqu'il s'agit d'obtenir une cellule transgénique en vue de produire un animal transgénique, la cellule hôte est de préférence une cellule souche
15 embryonnaire (cellule ES)(Thompson *et al.*, 1989). Le ciblage génique représente la modification dirigée d'un locus chromosomique par recombinaison homologue avec une séquence d'ADN exogène ayant une homologie de séquence avec la séquence endogène ciblée. On distingue différents types de ciblage génétique. Ici, le ciblage génique peut être utilisé plus particulièrement pour remplacer le gène JAK2 sauvage par
20 le gène variant JAK2 G1849T ou toute autre variant génétiquement similaire. Dans ce cas, le ciblage génique est appelé « Knock-in » (K-in). Alternativement, le ciblage génique peut être utilisé pour diminuer ou annihiler l'expression de JAK2 sauvage puis pour introduire le gène du variant de JAK2. Il s'agit alors de ciblage génique appelé « Knock-Out » (KO) (voir Bolkey *et al.*, 1989). La cellule selon l'invention se
25 caractérise en ce que le transgène est intégré de manière stable dans le génome de ladite cellule, et en ce que son expression est contrôlée par les éléments de régulation du gène endogène. Par intégration de manière stable, on entend signifier l'insertion du transgène dans l'ADN génomique de la cellule selon l'invention. Le transgène ainsi inséré est ensuite transmis à la descendance cellulaire. L'intégration du transgène est réalisée en
30 amont, en aval ou au milieu du gène endogène cible JAK2. Facultativement, un ou plusieurs gènes de sélection positive ou négative peuvent être utilisés. On peut aussi utiliser des régions d'ADN d'homologie avec le locus cible, de préférence au nombre de

deux, situé de part et d'autre de la portion du gène rapporteur ou de part et d'autres de la séquence complète à insérer. Par «régions d'ADN d'homologies», on entend désigner deux séquences d'ADN qui, après un alignement optimal et après comparaison, sont identiques pour habituellement au moins environ 90% à 95% des nucléotides et, 5 préférentiellement, au moins environ 98 à 99,5% des nucléotides. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels 10 informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Bien que aussi peu que 14 pb homologue à 100% soient suffisantes pour réaliser la recombinaison homologue dans les bactéries et les cellules de mammifère, des portions de séquences homologues plus longues sont préférées (en 15 général ces portions font au moins 2000 pb, de préférence au moins 5 000 pb pour chaque portion de séquence homologue. Avantagusement, la séquence JAK variant est insérée dans l'ensemble des éléments assurant une régulation du type endogène, c'est à dire un ensemble comprenant au moins le promoteur, des séquences régulatrices (enhanceurs, silenceurs, insulateurs), les signaux de terminaison du gène JAK : 20 endogène.

Selon un mode de réalisation particulier, le transgène JAK G1849T comprend au moins la séquence codante, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinaisons, par exemple une cassette Lox/Néo-TK/Lox ou 25 lox/Néo/lox ou FRT/Néo-TK/FRT ou FRT/Néo/FRT pouvant être également présente en position 5' de ladite séquence, et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative contenant par exemple le ou les gènes DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène. Le transgène de la présente invention est de préférence dérivé directement d'une séquence d'ADN exogène présente naturellement dans une 30 cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple par insertion de sites de restriction nécessaires au clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site spécifiques (séquences lox et flp).

A cet effet, le variant JAK2 G1849T peut être cloné dans un vecteur de clonage qui permet d'en assurer sa propagation dans une cellule hôte, et/ou facultativement dans un vecteur d'expression pour assurer l'expression du transgène. Les technologies de l'ADN recombinaut utilisées pour la construction du vecteur de clonage et/ou d'expression selon l'invention sont connues de l'homme du métier. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de l'ADN, l'amplification, et la purification ; les réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Ces techniques et les autres sont généralement réalisées selon Sambrook *et al.*, 1989). Les vecteurs incluent des plasmides, les cosmides, les bactériophages, les rétrovirus et autres virus animaux, les chromosomes artificiels, tels les YAC, BAC, HAC et autres vecteurs analogues.

Les méthodes pour générer des cellules transgéniques selon l'invention sont décrites dans Gordon *et al.*, 1989. Diverses techniques pour transfecter des cellules de mammifères ont été revues par Keon *et al.*, 1990. Le transgène selon l'invention, facultativement compris dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4,873,191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation (Lo, 1983), le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, polybrène, DEAE-Dextran...), ou encore l'infection virale (Van der Putten *et al.*, 1985).

25

Lorsque les cellules ont été transformées par le transgène, elles peuvent être cultivées *in vitro* ou bien être utilisées pour produire des animaux transgéniques non humains. Après transformation, les cellules sontensemencées sur une couche nourricière et/ou dans un milieu approprié. Les cellules contenant la construction peuvent être détectées en utilisant un milieu sélectif. Après un temps suffisant pour laisser les colonies pousser, celles-ci sont récupérées et analysées pour déterminer si un événement de

recombinaison homologue et/ou une intégration de la construction se sont produits. Pour réaliser le criblage des clones susceptibles de satisfaire à la recombinaison homologue, des marqueurs positifs et négatifs, encore appelés gènes de sélection, peuvent être insérés dans le vecteur de recombinaison homologue. Différents systèmes

5 de sélection des cellules ayant réalisé l'événement de recombinaison homologue ont été décrits (pour revue US 5,627,059). Ledit gène de sélection positive selon l'invention est de préférence choisi parmi les gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les antibiotiques, on peut citer de manière non exhaustive la néomycine, la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la phléomycine, la bléomycine, l'hygromycine, le

10 chloramphénicol, la carbénicilline, la généticine, la puromycine. Les gènes de résistance correspondant à ces antibiotiques sont connus de l'homme du métier ; à titre d'exemple, le gène de résistance à la néomycine rend les cellules résistantes à la présence de l'antibiotique G418 dans le milieu de culture. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène HisD, l'agent sélectif correspondant étant

15 l'histidinol. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de la guanine-phosphoribosyl-transférase (GpT), l'agent sélectif correspondant étant la xanthine. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de l'hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT), l'agent sélectif correspondant étant l'hypoxanthine. Le ou les marqueurs de sélection utilisés pour permettre d'identifier les

20 événements de recombinaison homologue peuvent affecter par la suite l'expression génique, et peuvent être éliminés, si nécessaire, par la mise en œuvre de recombinases site spécifiques telle la recombinase Cre spécifique des sites Lox (Sauer, 1994 ; Rajewsky *et al.*, 1996; Sauer, 1998) ou FLP spécifique des sites FRT (Kilby *et al.*, 1993).

25

Les colonies positives, c'est-à-dire contenant des cellules dans lesquelles au moins un événement de recombinaison homologue s'est produit sont identifiées par une analyse par southern blotting et/ou par des techniques de PCR. Le taux d'expression, dans les cellules isolées ou les cellules de l'animal transgénique selon l'invention, de l'ARNm

30 correspondant au transgène peut également être déterminé par des techniques comprenant l'analyse par northern blotting, l'analyse par hybridation *in situ*, par RT-PCR. Egalement les cellules ou tissus animaux exprimant le transgène peuvent être

identifiés en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine rapporteuse. Les cellules positives peuvent ensuite être utilisées pour réaliser les manipulations sur l'embryon et notamment l'injection des cellules modifiées par recombinaison homologue dans les blastocystes.

5

Pour ce qui concerne la souris, les blastocystes sont obtenus à partir de femelles superovulées de 4 à 6 semaines. Les cellules sont trypsinées et les cellules modifiées sont injectées dans le blastocèle d'un blastocyste. Après l'injection, les blastocystes sont introduits dans la corne utérine de femelles pseudo-gestantes. On laisse ensuite les
10 femelles aller jusqu'à leur terme et les portées résultantes sont analysées pour déterminer la présence de cellules mutantes possédant la construction. L'analyse d'un phénotype différent entre les cellules de l'embryon nouveau-né et les cellules du blastocyste ou des cellules ES permet de détecter les nouveau-nés chimériques. Les embryons chimériques sont ensuite élevés jusqu'à l'âge adulte. Les chimères ou
15 animaux chimériques, sont des animaux dans lesquels seule une sous-population de cellules possède un génome altéré. Les animaux chimériques présentant le gène ou les gènes modifiés, sont en général croisés entre eux ou avec un animal de type sauvage afin d'obtenir une descendance hétérozygote ou homozygote. Les hétérozygotes mâles et femelles sont ensuite croisés pour générer des animaux homozygotes. A moins qu'il
20 ne soit indiqué, l'animal transgénique non humain selon l'invention comprend des changements stables de la séquence nucléotidique des cellules de la lignée germinale.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule transgénique non humaine selon l'invention peut servir de cellule donneuse de noyau dans le cadre d'un transfert
25 de noyau ou transfert nucléaire. Par transfert nucléaire, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule vivante donneuse de vertébré, d'un organisme adulte ou au stade fœtal, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. Le noyau transféré est reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans des femelles porteuses
30 pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture. Différentes techniques de clonage nucléaire sont susceptibles d'être utilisées ; parmi celles-ci, il convient de citer de manière non

exhaustive celles qui font l'objet des demandes de brevet WO 95 17500, WO 97/07668, WO 97 07669, WO 98 30683, WO 99 01163 et WO 99 37143.

Ainsi, l'invention s'étend également à un animal transgénique non humain comprenant
 5 une séquence recombinante codant pour JAK2 V617F. Ces animaux peuvent être homozygotes ou hétérozygotes (JAK2 V617F / JAK2 V617F ou JAK2 V617F / JAK2). Ces animaux reproduisent notamment la polyglobulie de Vaquez, mais également tout syndrome myéloprolifératif induit par JAK2 V617F. Ils permettent donc de réaliser un criblage fonctionnel d'inhibiteurs de tyrosine kinase, notamment un criblage
 10 d'inhibiteurs spécifiques de JAK2 V617F.

Une autre alternative peut consister à injecter un vecteur adénoviral capable d'exprimer le variant JAK2 V617F pour induire de manière transitoire la polyglobulie de Vaquez et des syndromes myéloprolifératifs.

15 **Outils de diagnostic**

Dans un troisième aspect, l'invention vise les outils de diagnostic permettant de détecter la présence ou l'absence de la mutation JAK2 V617F chez un mammifère atteint ou susceptible de présenter un syndrome myéloprolifératif, notamment chez les patients
 20 montrant une polyglobulie ou dont on suspecte qu'ils présentent les symptômes de la polyglobulie de Vaquez.

A ce titre, l'invention se rapporte aux amorces et sondes permettant de détecter la présence ou l'absence de la mutation dans la séquence SEQ ID No 2 décrite ci-dessus.
 25 Plus particulièrement, l'invention a trait à un acide nucléique isolé ayant une séquence d'au moins 10, 12, 15, 20, 30, 40 ou encore 50 nucléotides consécutifs (par exemple de 10 à 30 nucléotides ou de 10 à 25 nucléotides) de l'exon 12 ou de la séquence SEQ ID No 3 ou 4 ci-dessous et comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹, par exemple de 10 à 30 nucléotides.

30

SEQ ID No 3

ctcatatgaaccaaattggtgtttcacaaaatcagaaatgaagatttgatatttaataagaaagccttggccaaggcacttttacaaag
 atttttaaaggcgtacgaagagaagtaggagactacggtaactgcatgaaacagaagttcttttaaaggcttggataaagcac
 acagaaactattcagagtctttcttgaagcagcaagtatgatgagcaagctttctcacaagcatttggttttaaattatggagtatg
 tt¹⁸⁴⁹ tctgtggagacgagaatattctggttcaggagtttgtaaaatttgatcactagatacatatctgaaaaagaataaaaatt
 5 gtataaatatattatggaaacttgaagttgctaacagttggcatgggcatgcattttctagaagaaaacacccttattcatggga
 atgtatgtgccaaaaatattctgcttatcagagaagaagacagggaagacaggaaatcctccttcatcaaacttagtgatcctgg
 cattagtattacagtttggccaaaggacattcttcaggag

La séquence soulignée désigne un exemple de zones en amont ou en aval permettant le
 10 design de sondes ou d'amorces spécifiques de la mutation en position 1849 (SEQ ID No
 4).

Exemple de différentes amorces et sondes préférées de l'invention :

15 SUR ADN, AMORCES DE PCR :

SENS 5'-GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3' (54804-54823) (SEQ ID No 5)

ANTI-SENS 5'-TTGCTTTCCTTTTTTCAACAAGA-3' (55240-55260) (SEQ ID No 6)

SUR ADN, AMORCES DE SEQUENÇAGE :

20 SENS 5'-CAGAACGTTGATGGCAGTTG-3' (54813-54832) (SEQ ID No 7)

ANTI-SENS 5'-TGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTT-3' (55207-55233) (SEQ
 ID No 8)

SUR CDNA, AMORCES DE PCR ET SEQUENÇAGE :

25 SENS 5'-CAACCTCAGTGGGACAAAGAA-3' (1386-1407) (SEQ ID No 9)

ANTI-SENS 5'-GCAGAATATTTTTGGCACATACA-3' (2019-2041) (SEQ ID No 10)

SONDES SNPS ET DETECTION DE MUTATION ET SIRNA (1829-1870) :

TTTTAAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGAGAATATTC (SEQ ID No 11)

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à une méthode de diagnostic *in vitro* ou *ex vivo* permettant de détecter la présence ou l'absence de mutation JAK2 V617F dans un échantillon.

5 Tests avec les acides nucléiques de l'invention

Dans un premier mode de réalisation, le variant G1849T (correspondant à la mutation JAK2 V617F) peut être détecté par analyse de la molécule d'acide nucléique du gène JAK2. Dans le cadre de la présente invention, on entend par "acide nucléique" un
10 ARNm, l'ADN génomique ou l'ADNc dérivé de l'ARNm.

La présence ou l'absence de l'acide nucléique du variant G1849T peut être détecté par séquençage, amplification et/ou hybridation avec une sonde et des amorces spécifiques, telles que décrites ci-dessus : séquence dérivée des SEQ ID No 3 ou 4 et SEQ ID No 5 à
15 11.

L'invention propose donc une méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour déterminer la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans un échantillon d'un patient atteint de PV ou susceptible de développer une PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif
20 comprenant :

- a) l'obtention d'un échantillon d'acide nucléique du patient,
- b) la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique,

caractérisée en ce que la présence du variant G1849T est une indication de PV ou de
25 tout autre syndrome myéloprolifératif.

L'échantillon d'acide nucléique peut être obtenu à partir de n'importe quelle source cellulaire ou biopsie de tissu. Des exemples non limitatifs de sources cellulaires disponibles incluent les cellules sanguines, notamment les cellules progénitrices
30 CD34+, ou toute autre cellule obtenue à partir de fluide corporel, tels que le sang, le plasma, le sérum... Selon le syndrome myéloprolifératif recherché, il est également possible de prélever des cellules buccales, épithéliales, des fibroblastes ou toute autre

cellule présente dans un tissu obtenu par biopsie, par exemple de tumeurs solides. L'ADN peut être extrait en utilisant toute méthode connue de l'état de la technique, telles que les méthodes décrites dans Sambrook et al. (1989). L'ARN peut également être isolé, par exemple à partir de tissus obtenus lors d'une biopsie, en utilisant des
 5 méthodes standard bien connues de l'homme du métier, telles que l'extraction par le guanidiumthiophenate-phenol-chlorophorme.

Le variant G1849T du gène JAK2 peut être détecté dans un échantillon d'ARN ou d'ADN, de préférence après amplification. Par exemple, l'ARN isolé peut être soumis à
 10 une transcription-réverse puis une amplification, telles que une réaction RT-PCR en utilisant les oligonucléotides spécifiques du site muté ou qui permettent l'amplification de la région contenant la mutation, par exemple l'exon 12 ou la séquence SEQ ID No 3 ou 4. L'expression « oligonucléotide » est utilisée ici pour désigner un acide nucléique d'au moins 10, de préférence entre 15 et 25 nucléotides, de préférence inférieur à 100
 15 nucléotides, et qui est capable de s'hybrider à l'ADN génomique de JAK2, à l'ADNc ou encore à l'ARNm.

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être marqués selon toute technique connue par l'homme du métier, tels que des marqueurs radioactifs, fluorescents ou
 20 enzymatiques. Un oligonucléotide marqué peut être utilisé comme sonde pour détecter la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2.

Ainsi, les sondes et amorces utiles selon l'invention sont celles qui s'hybrident spécifiquement à la région du gène JAK2 à proximité du nucléotide en position 1849
 25 (numérotation à partir de l'ATG marquant le début de la transcription).

Dans la méthode explicitée ci-dessus, les acides nucléiques peuvent être amplifiés par PCR avant la détection de la variation allélique. Les méthodes pour la détection de la variation allélique sont décrites par exemple dans Molecular Cloning - A Laboratory
 30 Manual" Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) et Laboratory Protocols for Mutation Detection, Ed. by U.

Landegren, Oxford University Press, 1996 et PCR, 2ème édition par Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

5 A ce titre, il est possible de combiner une étape d'amplification suivie par une étape de détection permettant de discriminer les échantillons en fonction de la présence ou de l'absence du variant recherché.

10 Différentes techniques adaptées à cet effet sont présentées dans EP 1 186 672, telles que le séquençage d'ADN, le séquençage par hybridation SSCP, DGGE, TGGE, l'analyse hétéroduplex, CMC, le clivage enzymatique de mésappariements, « hybridization based solid phase hybridization », les puces à ADN (DNA Chips), solution phase hybridization TaqmanTM (US 5,210,015 et US 5,487,972) », ainsi que la technique RFLP.

15 La détection peut être réalisée en utilisant différentes méthodes alternatives : FRET, fluorescence quenching, fluorescence polarisée, chémiluminescence, électrochémiluminescence, radioactivité et méthode colorimétrique.

20 La méthode selon l'invention peut inclure ou exclure les étapes consistant à obtenir l'échantillon et à extraire l'acide nucléique dudit échantillon.

25 Comme indiqué ci-dessus, l'échantillon utilisé peut être du sang ou tout autre fluide corporel ou tissu obtenu d'un individu. Après les étapes d'extraction et de purification de l'acide nucléique, l'amplification PCR au moyen des amorces décrites ci-dessus peut être utilisée pour améliorer la détection du signal.

30 Ainsi, la méthode selon l'invention peut comprendre l'étape d'amplification au moyen desdites amorces, suivie par une étape d'hybridation avec au moins une sonde, de préférence deux sondes qui s'hybrident en condition de forte stringence aux séquences correspondant à la région de la mutation G1849T mentionnée ci-dessus et la détection du signal produit par les marqueurs desdites sondes.

Détection de la protéine mutée JAK2 V617F

5

Selon un autre mode de réalisation, le variant peut être détecté directement au sein de la protéine JAK2.

10 A cet effet, l'invention vise une méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :

- a) l'obtention d'un échantillon du patient,
 - b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F,
- 15 caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

Ledit variant JAK2 V617F peut être détecté par toute méthode appropriée connue de l'état de la technique.

20 Plus particulièrement, un échantillon, obtenu d'un individu, peut être mis en contact avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, par exemple un anticorps qui est capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée (et de tout autre protéine).

25 Les anticorps de la présente invention peuvent être des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou des portions de molécules d'immunoglobuline comprenant les portions connues de l'état de la technique comme correspondant aux fragments de liaison à l'antigène [fragment humain, humain, F(ab')₂ et F(v)].

30

Ces anticorps peuvent être immunoconjugués, par exemple avec une toxine ou un marqueur.

Les protocoles pour l'obtention d'anticorps polyclonaux sont bien connus de l'homme du métier. Typiquement, de tels anticorps peuvent être obtenus par l'administration du variant JAK2 V617F par injection souscutanée à des lapins blancs de Nouvelle-Zélande qui ont préalablement été préparés pour obtenir un sérum pré-immunitaire. Les antigènes peuvent être injectés jusqu'à 100 µl par site à 6 différents sites. Les lapins sont préparés deux semaines avant la première injection puis périodiquement stimulés par le même antigène, environ trois fois toutes les six semaines. Un échantillon de sérum est alors obtenu dix jours après chaque injection. Les anticorps polyclonaux sont ensuite purifiés du sérum par chromatographie d'affinité en utilisant la protéine JAK2 V617F pour capturer les anticorps.

Les anticorps monoclonaux sont préférés aux anticorps polyclonaux à cause de leur haute spécificité.

L'obtention de tels anticorps monoclonaux est à la portée de l'homme du métier, sachant que le variant JAK2 V617F présente une structure 3D différente de la protéine JAK2 sauvage. L'expression « anticorps monoclonal » signifie un anticorps qui est capable de reconnaître seulement un épitope d'un antigène.

Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés par immunisation d'un mammifère, par exemple une souris, un rat, ou d'autres mammifères avec le variant JAK2 V617F purifié. Les cellules du mammifère immunisé produisant les anticorps sont isolées et fusionnées avec des cellules de myélomes ou d'hétéro-myélomes pour produire des cellules hybrides (hybridomes).

Les cellules d'hybridomes produisant l'anticorps monoclonal sont utilisées comme sources pour la production de l'anticorps. Les techniques de génération d'anticorps n'impliquant pas une immunisation sont également visées par l'invention. Il s'agit par exemple de la technologie « phage display ».

Les anticorps dirigés contre le variant JAK2 V617F peuvent dans certains cas présenter une réaction croisée avec la protéine JAK2 sauvage. Si tel est le cas, une sélection des anticorps spécifiques du variant V617F est nécessaire. A ce titre, on peut utiliser par

exemple une chromatographie d'affinité avec la protéine JAK2 sauvage pour capturer les anticorps qui présenterait une réaction croisée avec JAK2 sauvage.

Ainsi, l'invention vise un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant JAK2 V617F ainsi que les lignées d'hybridomes le produisant.

L'invention porte également sur un test ELISA au moyen dudit anticorps pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon.

Une alternative à l'utilisation des anticorps peut consister par exemple à la préparation et l'identification d'haptamères qui sont des classes de molécules permettant une reconnaissance moléculaire spécifique.

Les haptamères sont des oligonucléotides ou des oligopeptides qui peuvent virtuellement reconnaître n'importe quelle classe de molécules cibles avec une haute affinité et spécificité.

Kits

Dans un autre aspect, l'invention concerne des kits pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F.

Le kit de l'invention peut comprendre une ou plusieurs sondes ou amorces telles que définies ci-dessus pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

Le kit peut également comprendre une polymérase thermorésistante pour l'amplification PCR, une ou plusieurs solutions pour l'amplification et/ou l'étape d'hybridation, ainsi que tout réactif permettant la détection du marqueur.

30 Dans un autre mode de réalisation, le kit comprend un anticorps tel que défini ci-dessus.

Les kits de l'invention peuvent contenir en outre tout réactif adapté à l'hybridation ou à la réaction immunologique sur support solide.

siRNA de l'invention

5

Dans un quatrième aspect, l'invention porte également sur des siRNA permettant de diminuer de plus de 50%, 75%, 90% ou 95% ou encore de plus de 99% l'expression de JAK2 mutée en position 617, en particulier de JAK2 V617F. Ces siRNA peuvent être injectés dans les cellules ou tissus par lipofection, transduction, ou électroporation. Ils
10 permettent de détruire spécifiquement les ARNm codant pour JAK2 V617F impliquant de nombreuses applications thérapeutiques possibles, notamment le traitement de la polyglobulie de Vaquez.

Des siRNA sont décrits dans US 60/068562 (CARNEGIE). L'ARN est caractérisé en ce
15 qu'il possède une région avec une structure double brin (db). L'inhibition est spécifique de la séquence cible, la séquence nucléotidique d'un brin de la région db de l'ARN comprenant au moins 25 bases et étant identique à la portion du gène cible. La séquence nucléotidique de l'autre brin de la région db de l'ARN est complémentaire à celle du premier brin et à la portion du gène cible. Par ailleurs, la demande WO 02/44 321
20 (MIT/MAX PLANCK INSTITUTE) décrit un ARN double brin (ou des oligonucléotides de même nature synthétisés chimiquement) dont chaque brin a une longueur de 19 à 25 nucléotides et qui est capable d'inhiber spécifiquement l'expression post transcriptionnelle d'un gène cible par un processus d'interférence ARN afin de déterminer la fonction d'un gène et afin de moduler cette fonction dans une cellule ou
25 un organisme. Enfin, WO 00/44895 (RIBOPHARMA) porte sur un procédé d'inhibition de l'expression d'un gène cible donné dans une cellule eucaryote in vitro, dans lequel un ARNdb formé de deux ARN simples brins séparés est introduit dans la cellule, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible caractérisé en ce que la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.
30 L'homme du métier pourra se référer à l'enseignement contenu dans ces documents pour la préparation des siRNA de la présente invention.

Plus spécifiquement, l'invention porte sur des ARN double brin d'environ 15 à 30 nucléotides, 19 à 25 nucléotides, ou de préférence environ 21 nucléotides de long complémentaire (brin 1) et identique (brin 2) à la séquence SEQ ID No 3 comprenant la mutation G1849T. Ces siRNA de l'invention peuvent comporter en outre un
 5 dinucléotide TT ou UU à l'extrémité 3'.

De nombreux programmes sont disponibles pour le design des siRNA de l'invention:

- "siSearch Program" à http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.6.html ("Improved and automated prediction of effective siRNA", Chalk AM, Wahlesdelt C, and Sonnhammer ELL, Biochemical and Biophysical Research Communications,
 10 2004).

- "SiDirect" à <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php> (Direct: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference, Yuki Naito et al, Nucleic Acids Res, Vol. 32, No. Web Server issue © Oxford University Press 2004).

- "siRNA Target Finder" de Ambion à l'adresse
 15 http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_tools.html

- Le " siRNA design tool " du Whitehead Institute of Biomedical Research au MIT à l'adresse <http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAext/>

D'autres programmes sont listés à :

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2files/siRNAs.htm>,
 20 notamment http://athena.bioc.uvic.ca/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=sirna

Par exemple, pour la séquence TATGGAGTATGTT¹⁸⁴⁹TCTGTGGAGA (SEQ ID No 12), le siRNA sens est UGGAGUAUGUUUCUGUGGAdTdT (SEQ ID No 13) et le siRNA antisens est UCCACAGAAACAUAUACUCCAdTdT (SEQ ID No 14).

Dans un mode de réalisation particulier, les siRNA de l'invention décrit ci-dessus sont
 25 testés et sélectionnés pour leur capacité à réduire, voir bloquer spéciquement l'expression de JAK2 V617F en affectant le moins possible l'expression de JAK2 sauvage. Par exemple, l'invention vise des siRNA permettant une diminution supérieure à 80%, 90%, 95% ou 99 % de l'expression de JAK2 V617F et aucune diminution ou une diminution inférieure à 50%, 25%, 15%, 10% ou 5% ou encore inférieure à 1% de
 30 JAK2 sauvage.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne une molécule ddRNAi telle que décrite de manière générique dans la demande WO 01/70949 (Benitec) mais ciblant spécifiquement JAK2 V617F. Le ddRNAi de l'invention permet l'extinction de la séquence codant pour JAK2 V617F et comprend i) une séquence identique à la SEQ ID
 5 No 3, 4 ou 11; (ii) une séquence complémentaire à la séquence défini en (i); (iii) un intron séparant lesdites séquences (i) et (ii); l'introduction de cette construction dans une cellule ou un tissu produisant un ARN capable d'altérer l'expression de JAK2 V617F. L'invention porte également sur un animal non humain génétiquement modifié comprenant une ou plusieurs cellules contenant une construction génétique capable de
 10 bloquer, de retarder ou de réduire l'expression de JAK2 V617F dans l'animal. La méthode de production d'un tel animal génétiquement modifié est présentée dans WO 04/022748 (Benitec).

Méthodes de criblage

15

Dans un cinquième aspect, l'invention a pour objet une méthode de criblage d'inhibiteurs spécifiques de JAK2 V617F.

Par "inhibiteurs spécifiques", on entend désigner des composés présentant un ratio IC50
 20 sur JAK2 / IC50 sur JAK2 V617F supérieur à 5, 10, 25, ou encore 50. Par exemple, le composé possède une IC50 JAK2 V617F inférieure à 1 μ M, de préférence 100 nM alors qu'il possède une IC50 JAK2 supérieure à 5 μ M ou 10 μ M.

Cette méthode peut être mise en œuvre à l'aide de la protéine de l'invention, d'une
 25 fraction membranaire comprenant ladite protéine, une cellule exprimant ladite protéine ou encore un animal transgénique non humain tel que décrit plus haut.

Ainsi, l'invention porte sur un test permettant de déterminer l'inhibition spécifique de JAK2 V617F par un ou plusieurs composés comprenant les étapes consistant à mettre
 30 en contact un ou plusieurs composés avec la protéine JAK2 V617F décrite ci-dessus, une fraction membranaire comprenant JAK2 V617F ou encore une cellule exprimant

JAK2 V617F décrite ci-dessus dans des conditions appropriées pour une fixation et une détection de la fixation spécifique et/ou de l'inhibition de JAK2 V617F.

Ce procédé peut comprendre en outre une mesure de la fixation sur JAK2 sauvage.

Ce procédé peut également consister en une succession de tests de plusieurs molécules et comprendre une étape de sélection des molécules présentant une IC50 pour JAK2 V617F inférieure à 1 μ M, de préférence 100 nM.

Ce procédé peut comprendre en outre une étape de sélection négative des molécules mentionnées ci-dessus qui possèdent une IC50 pour JAK2 inférieure à 5 μ M ou 1 μ M.

10 L'invention porte sur un criblage in vitro tel que décrit ci-dessus dans lequel on détermine par immunoprécipitation l'inhibition de la phosphorylation de JAK2 V617F.

L'invention porte également sur un criblage in vivo sur des cellules progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans érythropoïétine (Epo). De telles cellules isolées de patients atteints de la polyglobulie de Vaquez. Les cellules CD34+ JAK2 V617F peuvent être mises en culture dans un milieu comprenant du SCF et IL-3. Les composés sont rajoutés dans le milieu de culture et on détermine la capacité des cellules à proliférer et à se différencier en cellules 36+/GPA-. On sélectionne les composés pour lesquels une diminution du nombre de clones 36+/GPA- est observée.

20 Ainsi, l'invention porte sur la méthode de criblage ci-dessus au moyen de cellules primaires progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans érythropoïétine (Epo) ou sur des lignées cellulaires devenues facteur indépendantes par introduction du variant JAK2 V617F.

On peut également utiliser toute lignée cellulaire de mammifère décrite ci-dessus exprimant JAK V617F recombinante.

L'invention porte également sur une méthode pour l'identification de candidats médicaments comprenant les étapes consistant à administrer des composés à un animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F tel que décrit plus haut, ledit animal

30 reproduisant la polyglobulie de Vaquez et/ou étant atteint d'un syndrome myéloprolifératif associé à la présence de JAK2 V617F, à déterminer l'effet du composé et sélectionner les candidats médicaments pour lesquels on observe une diminution ou

un blocage de la prolifération et de la différenciation spontanées des érythroblastes de polyglobulie de vaquez ou une diminution de la prolifération cellulaire associé à la présence de JAK2 V617F.

- 5 Plus particulièrement, cette méthode est réalisée avec une souris K-in JAK2 V617F ou un rat K-in JAK2 V617F tel que décrit ci-dessus.

Parmi ces composés, on peut citer par exemple les siRNA ciblant l'exon 12 muté de JAK2 mentionnés ci-dessus, en particulier des siRNA ciblant la séquence SEQ ID No 3,
10 4 ou encore la séquence SEQ ID No 11 comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹.

Un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation desdits SiRNA ou ddRNAi décrits ci-dessus, et des composés inhibant spécifiquement JAK2 V617F pour la fabrication d'un médicament. Ledit médicament est notamment destiné au traitement des cancer du
15 sang, en particulier les syndromes myéloprolifératifs comprenant la Polyglobulie de Vaquez, la thrombocythénie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive et la leucémie myéloïde chronique (LMC). Ledit médicament est également destiné au traitement d'autres hémopathies malignes; associées à la mutation JAK2 V617F, et le cas échéant des tumeurs solides, des carcinomes, des mélanomes et des
20 neuroblastomes, qui expriment JAK2 V617F.

Pour la suite de la description et pour les exemples, on se référera aux figures dont la légende est indiquée ci-dessous.

25 **Légendes**

Figure 1: Découverte du rôle clé de JAK2 dans la PV

A l'état basal, JAK2 est fixé sur la box 1 à l'état non phosphorylé. La liaison à l'EPO modifie la conformation du récepteur et permet la transphosphorylation de JAK2 qui en
30 retour phosphoryle les résidus intracytoplasmiques de EPO-R et recrute ainsi les différents effecteurs positifs (->) ou négatifs (-|) de la transduction du signal.

Figure 2 : Mise au point d'un modèle de culture de progéniteurs CD34+ de PV qui peuvent se différencier sans érythropoïétine.

2A- culture avec Epo, SCF et IL-3

2B- culture sans Epo.

5 **Figure 3: L'inhibition des voies JAK-STAT, Pi3-K et Src kinase empêche la différenciation érythroïde spontanée.**

Figure 4: Protocole d'inhibition de JAK2 dans les progéniteurs de PV.

Figure 5: Résultats de l' inhibition de JAK2 dans les progéniteurs de PV.

5A- Diminution de la capacité de clonage des 36+/gpa- Culture J1-J6 en SCF-IL3, électroporation J5 tri J6 (morpho/36+/gpa-).

Méthyl SCF seul. Compte à J13 (J7 post tri)

5B- Structure de JAK2 avec la mutation V617F (exon 12)

Exemple 1: Identification de la mutation JAK2 V617F dans 39/43 patients.

15 La mise au point d'un modèle de culture cellulaire des progéniteurs pathologiques et l'utilisation d'inhibiteurs biochimiques nous a permis d'établir que les voies JAK2-STAT5, PI3 kinase, et Src kinases sont nécessaires à la différenciation indépendante de l'Epo des progéniteurs de PV (Ugo et al, 2004). Ces résultats nous ont conforté dans
20 notre hypothèse selon laquelle la lésion moléculaire primaire à l'origine de la PV devait être une anomalie d'une protéine clef aboutissant à la dérégulation d'une voie de signalisation, comme une mutation d'une tyrosine kinase lui conférant une activité constitutive. Néanmoins, c'est l'étude de 43 patients atteints de la polyglobulie de Vaquez qui a permis d'identifier le rôle clé de la protéine JAK2, qui est la protéine
25 située le plus en amont dans ces différentes voies de signalisation, et qui est commune aux voies de signalisation des récepteurs aux cytokines pour lesquelles des anomalies de réponse ont été décrites dans la PV. Nous avons étudié l'implication de la protéine kinase JAK2 dans la physiopathologie de la PV par 3 abords complémentaires :

- un abord fonctionnel (inhibition de JAK2 dans les cellules de PV par ARN
30 interférence),
- un abord génomique (séquençage des 23 exons du gène), et

- un abord biochimique à la recherche d'une anomalie de phosphorylation de JAK2 à l'origine d'une activation constitutive.

Le matériel biologique utilisé provient de patients consentants atteints de polyglobulie et correspond aux résidus de prélèvements réalisés à visée diagnostique adressés au
5 Laboratoire Central d'Hématologie de l'Hotel Dieu, et à des saignées thérapeutiques.

1.1 Etude fonctionnelle

L'étude de la fonction de JAK2 dans les érythroblastes de patients atteints de polyglobulie de Vaquez a été réalisée en transduisant par électroporation des
10 érythroblastes de PV avec un siRNA spécifique de la séquence JAK2 (AMBION, Huntingdon, Angleterre) reconnaissant comme cible une séquence située sur l'exon 15 de l'ARNm de JAK2. Nous avons montré que l'inhibition de JAK2 diminuait fortement la capacité de clonage et la différenciation « spontanée » des progéniteurs de PV en l'absence d'Epo. Les progéniteurs érythroblastiques normaux transfectés avec le siRNA
15 JAK2 ont un potentiel clonogénique diminué de 70% par rapport au siRNA contrôle ce qui confirme l'efficacité de la transfection avec le siRNA JAK2. Dans la PV, les effets de l'inhibition de JAK2 dans les progéniteurs érythroblastiques ont été étudiés dans un modèle de culture sans Epo, permettant d'étudier les cellules du clone malin. Nous avons comparé le potentiel clonogénique, l'apoptose et la différenciation des
20 progéniteurs érythroblastiques de PV après transfection par un siRNA JAK2 comparé à un siRNA contrôle. L'étude du potentiel clonogénique des progéniteurs de PV cultivés sans Epo montre une très nette diminution du nombre de colonies après transfection du siRNA JAK2 par rapport au siRNA contrôle. L'étude en cytométrie de flux de l'apoptose de ces cellules montre une augmentation significative de l'apoptose dans les
25 cellules transfectées par le siRNA JAK2 comparées au siRNA non relevant (70 versus 53%). L'étude des effets du siRNA JAK2 sur la différenciation (acquisition de la Glycophorine A détectée en cytométrie de flux), ne montre qu'une légère différence entre les progéniteurs transfectés par le siRNA JAK2 versus le siRNA contrôle.

30 Les résultats des études cellulaires ont donc montré que JAK2 était nécessaire à la différenciation indépendante de l'Epo des progéniteurs érythroïdes de PV. Les premiers résultats des études biochimiques (immunoprécipitation) montrent une phosphorylation

de JAK2 plus prolongée après déprivation en cytokines des progéniteurs érythroïdes de PV par rapport à des cellules normales.

1.2 Etude génomique de JAK2

5

La PCR sur les 23 exons a été mise au point sur un sujet normal à partir d'ADN génomique. Puis nous avons étudiés 3 patients atteints de PV après avoir extrait l'ADN génomique de cellules érythroïdes obtenus in vitro après culture cellulaire.

Nous avons identifié une mutation ponctuelle située dans l'exon 12 de JAK2, présente chez 2 des 3 patients testés. Cette mutation touche la base n° 1849 de la séquence codante [numérotation débutant à l'ATG], GenBank NM_004972) transforme le codon 617 de la protéine JAK2 (V617F).

- Codon 617 normal : gtc code pour une Valine (V)
- Codon 617 muté : ttc code pour une Phénylalanine (F)

15 Nous avons vérifié grâce aux bases de données publiées sur Internet qu'il ne s'agissait pas d'un polymorphisme connu.

Nous avons ensuite élargi la cohorte. A ce jour, la mutation a été retrouvée chez 39 patients atteints de PV sur les 43 cas testés. Aucun témoin (15 cas testés) ou patient atteint de polyglobulie secondaire (18 cas testés) n'a été trouvé porteur de la mutation.

20

Résultats du séquençage chez les patients

- 39 mutés / 43 PV testés (90%)
- 2/3 hétérozygotes
- 13/39 « homozygotes » soit 30% des cas (même proportion que la perte d'hétérozygotie en 9p)

25

Contrôles

- 0 cas mutés sur 33 témoins testés
 - Dont 15 sujets normaux
 - Et 18 polyglobulies secondaires (pas de colonies spontanées)

30

La découverte de cette anomalie de JAK2 explique l'hypersensibilité à de nombreux facteurs de croissance impliquée dans la PV (Epo, TPO, IL-3, IL-6, GM-CSF, insuline).

En effet, JAK2 est une protéine impliquée dans les voies de signalisation des récepteurs de ces cytokines.

De plus, l'association de JAK2 avec R-Epo est singulière en cela que JAK2 est fixé à R-Epo de façon constitutive : l'association JAK2/R-Epo initiée dans l'appareil de Golgi, est nécessaire au processing de R-Epo à la membrane des érythroblastes. Une anomalie de JAK2 à l'origine de modifications de l'association de JAK2 avec R-Epo pourrait donc expliquer la prédominance de l'hyperplasie médullaire sur la lignée érythroblastique, alors que cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Par ailleurs, Moliterno et coll (Moliterno et al., 1998; Moliterno et Spivak, 1999) ont mis en évidence un défaut d'expression membranaire de mpl, lié à un défaut de glycosylation. Il est possible que JAK2 soit, par analogie avec R-Epo, nécessaire au processing de c-mpl. L'anomalie de JAK2 pourrait alors expliquer le défaut d'expression membranaire de c-mpl, retrouvé dans la PV.

JAK2 se lie à R-Epo sur son domaine proximal au niveau d'un domaine très conservé, la Box2. En l'absence de stimulation par l'Epo, JAK2 est constitutivement fixé à R-Epo, mais sous forme non phosphorylée donc non active. Après stimulation du récepteur par l'Epo, les deux molécules JAK2 se phosphorylent, puis phosphorylent R-Epo, ce qui permet le recrutement puis la phosphorylation d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal, comme les protéines STAT5, Grb2, PI3K. La protéine JAK2 présente, comme toutes les JAKs, un domaine kinase fonctionnel (JH1), un domaine pseudo-kinase sans activité tyrosine kinase (JH2), et plusieurs domaines conservés (JH3-JH7), caractéristiques des membres de la famille des JAKs. Le domaine JH2 semble impliqué dans la régulation de l'activité tyrosine kinase de JAK2. D'après les données disponibles de cartographie protéique de JAK2 (Lindauer, 2001), l'acide aminé 617 est situé dans ce domaine JH2, et d'après des études de modélisation, dans une région particulièrement importante pour la régulation de l'activité kinase.

30

Au delà de l'intérêt physiopathologique de cette découverte (compréhension des mécanismes d'indépendance aux cytokines, démembrement des différents SMP), la

mise en évidence de la mutation chez un patient offre pour la première fois un test permettant d'affirmer le diagnostic. Dans une démarche médicale diagnostique, la recherche de la mutation de JAK2 pourra se faire sur les polynucléaires sanguins, qui appartiennent au clone malin.

- 5 L'invention offre également la mise au point d'un traitement spécifique, de type inhibiteur de kinase spécifique de la protéine mutée, ou thérapie génique.

REFERENCES

- Andersson, P., LeBlanc, K., Eriksson, B. A., and Samuelsson, J. (1997). No
5 evidence for an altered mRNA expression or protein level of haematopoietic cell
phosphatase in CD34+ bone marrow progenitor cells or mature peripheral blood cells in
polycythaemia vera. *Eur J Haematol* 59, 310-7.
- Asimakopoulos, F. A., Hinshelwood, S., Gilbert, J. G., Delibrias, C. C., Gottgens,
B., Fearon, D. T., and Green, A. R. (1997). The gene encoding hematopoietic cell
10 phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera.
Oncogene 14, 1215-22.
- Casadevall, N., Vainchenker, W., Lacombe, C., Vinci, J., Chapman, J., Breton-
Gorius, J., and Varet, B. (1982). Erythroid progenitors in Polycythemia Vera.
demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum-free cultures.
15 *Blood* 59, 447-451.
- Hess, G., Rose, P., Gamm, H., Papadileris, S., Huber, C., and Seliger, B. (1994).
Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia
vera. *Br J Haematol* 88, 794-802.
- Kralovics, R., Guan, Y., and Prchal, J. T. (2002). Acquired uniparental disomy of
20 chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 30,
229-36.
- Le Couedic, J. P., Mitjavila, M. T., Villeval, J. L., Feger, F., Gobert, S., Mayeux,
P., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (1996). Missense mutation of the
erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 87,
25 1502-11.
- Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K. R., and Kroemer, R. T. (2001). Prediction of
the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal
domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 14, 27-37.
- Means, R. T., Krantz, S. B., Sawyer, S., and Gilbert, H. (1989). Erythropoietin
30 receptors in polycythemia vera. *J Clin Invest* 84, 1340.

- Moliterno, A. R., Hankins, W. D., and Spivak, J. L. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 338, 572-580.
 - Moliterno, A. R., and Spivak, J. L. (1999). Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 94, 2555-61.
 - Pahl, H. L. (2000). Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 267, 3395-401.
 - Pearson (2001). Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol.* 38, 21-4.
 - 10 - Roder S, S. C., Meinhardt G, Pahl HL. (2001). STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 29, 694-702.
 - Silva, M., Richard, C., Benito, A., Sanz, C., Olalla, I., and Fernandez-Luna, J. L. (1998). Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 338, 564-71.
 - 15 - Temerinac, S., Klippel, S., Strunck, E., Roder, S., Lubbert, M., Lange, W., Azemar, M., Meinhardt, G., Schaefer, H. E., and Pahl, H. L. (2000). Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 95, 2569-76.
 - Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., L  cluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independant differentiation of erythroid progenitors in Polycythemia Vera. *Experimental Hematology* 32, 179-187.
 - 20
-

REVENDICATIONS

- 5 1. Protéine isolée JAK2 (Janus kinase 2), caractérisée en ce qu'elle comprend une mutation sur l'acide aminé 617, plus particulièrement la mutation V617F, ci-après dénommé "variant JAK2 V617F", dont la séquence est présentée à la SEQ ID No 1, ou une séquence similaire chez d'autres mammifères.
- 10 2. Séquence nucléotidique codant pour le variant JAK2 V617F selon la revendication 1, notamment la séquence SEQ ID No 2 possédant la mutation t/g en position 1849 à partir de l'ATG marquant le début de la transcription.
- 15 3. Vecteur de clonage et/ou d'expression viral, plasmidique ou sous forme d'ADN nu caractérisé en ce qu'il comprend la séquence selon la revendication 2 sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules de mammifères.
- 20 4. Cellule de mammifère exprimant le variant JAK2 V617F recombinant selon la revendication 1.
- 25 5. Animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F recombinant selon la revendication 1.
6. Animal transgénique non humain selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souris ou d'un rat ayant intégré dans son génome au moins la séquence codante pour JAK2 V617F par recombinaison homologue ou recombinaison dirigée.
- 30 7. Animal transgénique non humain selon la revendication 5 ou 6 caractérisé en ce qu'il est homozygote JAK2 V617F / JAK2 V617F ou hétérozygote JAK2 V617F / JAK2, lesdits animaux reproduisant la polyglobulie de Vaquez et/ou des syndromes myéloprolifératifs induits par JAK2 V617F.

8. Sondes ou amorces comprenant de 10 à 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID No 3 ou 4 et comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹.

9. Sondes ou amorces selon la revendication 8 sélectionnées parmi les séquences SEQ ID No 5 à 11.

10. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour déterminer la présence ou l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans un échantillon d'un patient atteint de PV ou susceptible de développer une PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :

- 10 a) l'obtention d'un échantillon d'acide nucléique du patient,
 - b) la détection de la présence ou de l'absence du variant G1849T du gène JAK2 dans ledit échantillon d'acide nucléique,
- caractérisée en ce que la présence du variant G1849T est une indication de PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

11. Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'hybridation avec au moins une sonde selon l'une des revendications 8 à 9.

12. Méthode selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'amplification par réaction PCR avec au moins une paire d'amorces selon l'une des revendications 8 à 9.

13. Méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle est effectuée sur les ARNm d'un individu et comprenant une réaction RT-PCR.

14. Méthode selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'amplification au moyen desdites amorces, suivie par une étape d'hybridation avec au moins une sonde, de préférence deux sondes qui s'hybrident en condition de forte stringence aux séquences correspondant à la région de la mutation G1849T et la détection du signal produit par les marqueurs desdites sondes, les sondes et amorces étant définies à la revendication 8 ou 9.

15. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :

- a) l'obtention d'un échantillon du patient,
- 5 b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F, caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

10 16. Méthode selon la revendication 15 comprenant la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, de préférence un anticorps capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée.

15 17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou des portions de molécules d'immunoglobuline comprenant les portions connues de l'état de la technique comme correspondant aux fragments de liaison à l'antigène [fragment humain, humain, F(ab')₂ et F(v)].

20 18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un test ELISA.

19. Anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant JAK2 V617F.

25 20. Hybridome produisant un anticorps selon la revendication 18.

21. Kit pour détecter le variant JAK2 V617F dans une tumeur comprenant une ou plusieurs amorces ou sondes telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

30 22. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F comprenant une ou

15. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :
- a) l'obtention d'un échantillon du patient,
 - 5 b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F, caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.
16. Méthode selon la revendication 15 comprenant la mise en contact de l'échantillon
10 avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, de préférence un anticorps capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée.
17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les anticorps sont des
15 anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou des fragments de liaison à l'antigène F(ab')₂ et F(v).
18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un test ELISA.
- 20 19. Anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant JAK2 V617F.
20. Hybridome produisant un anticorps selon la revendication 19.
21. Kit pour détecter le variant JAK2 V617F dans une tumeur comprenant une ou
25 plusieurs amorces ou sondes telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.
22. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout
30 autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F comprenant une ou plusieurs sondes ou amorces telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la

15. Méthode *ex vivo* ou *in vitro* pour détecter la présence ou l'absence du variant JAK2 V617F dans un échantillon d'un patient atteint ou susceptible de développer la PV ou tout autre syndrome myéloprolifératif comprenant :

- a) l'obtention d'un échantillon du patient,
- 5 b) la détection de la présence ou de l'absence du variant JAK2 V617F, caractérisée en ce que la présence dudit variant est une indication de la PV ou de tout autre syndrome myéloprolifératif.

16. Méthode selon la revendication 15 comprenant la mise en contact de l'échantillon
10 avec un anticorps spécifique du variant V617F de la protéine JAK2, de préférence un anticorps capable de faire la distinction entre le variant V617F et la protéine JAK2 non mutée.

17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que les anticorps sont des
15 anticorps monoclonaux ou polyclonaux, simple chaîne ou double chaîne, des anticorps chimériques, humanisés ou des fragments de liaison à l'antigène F(ab')₂ et F(v).

18. Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un test ELISA.

20 19. Anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le variant JAK2 V617F.

20. Hybridome produisant un anticorps selon la revendication 19.

21. Kit pour détecter le variant JAK2 V617F dans une tumeur comprenant une ou
25 plusieurs amorces ou sondes telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

22. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout
30 autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F comprenant une ou

plusieurs sondes ou amorces telles que définies à la revendication 8 ou 9 pour la détection spécifique de la présence ou de l'absence de la mutation G1849T dans le gène JAK2.

- 5 23. Kit selon la revendication 21 ou 22 comprenant en outre au moins un élément choisi parmi une polymérase thermorésistante pour l'amplification PCR, une ou plusieurs solutions pour l'amplification et/ou l'étape d'hybridation, ainsi que tout réactif permettant la détection du marqueur.
- 10 24. Kit pour déterminer si un patient est atteint de la polyglobulie de Vaquez ou de tout autre syndrome myéloprolifératif impliquant le variant JAK2 V617F comprenant un anticorps selon la revendication 19.
25. siRNA capable de diminuer de plus de 50% ou encore de plus de 95% l'expression
15 du variant JAK2 V617F selon la revendication 1.
26. siRNA selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il possède de 19 à 25 nucléotides, de préférence 21 nucléotides de long, la séquence d'un premier brin étant identique et la séquence d'un deuxième brin étant complémentaire à la séquence SEQ ID
20 No 3, SEQ ID No 4 ou encore la séquence SEQ ID No 11 comprenant le nucléotide muté t¹⁸⁴⁹.
27. siRNA selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce qu'il induit une diminution supérieure à 80% ou 95% de l'expression de JAK2 V617F et qu'il n'induit qu'une
25 diminution inférieure à 25% ou 5% de l'expression de JAK2 sauvage.
28. Procédé permettant de déterminer l'inhibition spécifique de JAK2 V617F par un ou plusieurs composés comprenant les étapes consistant à :
a) mettre en contact un ou plusieurs composés avec la protéine JAK2 V617F selon la
30 revendication 1, une fraction membranaire comprenant JAK2 V617F, ou encore une cellule exprimant JAK2 V617F selon la revendication 4 dans des conditions appropriées pour une fixation et/ou de l'inhibition et,

b) une détection de la fixation spécifique et/ou de l'inhibition de JAK2 V617F.

29. Procédé de criblage comprenant une succession de tests selon la revendication 28 de plusieurs molécules et une étape de sélection des molécules présentant une IC50 pour
5 JAK2 V617F inférieure à 1 μ M, de préférence 100 nM.

30. Procédé selon la revendication 29 comprenant en outre une sélection négative des molécules qui possèdent une IC50 pour JAK2 inférieure à 5 μ M ou 1 μ M.

10 31. Procédé de criblage in vitro selon l'une des revendication 28 à 30 dans lequel on détermine par immunoprécipitation l'inhibition de la phosphorylation de JAK2 V617F.

32. Procédé de criblage in vivo selon l'une des revendication 28 à 30 sur des cellules primaires progénitrices CD34+ JAK2 V617F qui sont capables de se différencier sans
15 érythropoïétine (Epo) ou sur des lignées cellulaires devenues facteur indépendantes par introduction du variant JAK2 V617F.

33. Procédé de criblage in vivo selon l'une des revendication 28 à 32 au moyen d'une cellule selon la revendication 4.

20

34. Procédé pour l'identification de candidats médicaments comprenant les étapes consistant à :

a) administrer des composés à un animal transgénique non humain exprimant JAK2 V617F tel que défini à l'une des revendications 5 à 7, ledit animal reproduisant la
25 polyglobulie de vaquez et/ou étant atteint d'un syndrome myéloprolifératif associé à la présence de JAK2 V617F,

b) déterminer l'effet du composé et sélectionner les candidats médicaments pour lesquels on observe une diminution ou un blocage de la prolifération et de la différenciation spontanées des érythroblastes de polyglobulie de vaquez ou une
30 diminution de la prolifération cellulaire associé à la présence de JAK2 V617F.

35. Procédé selon l'une des revendications 28 à 34, caractérisé en ce que le composé est un siRNA selon l'une des revendications 25 à 27.

5 36. Utilisation des SiRNA selon l'une des revendications 25 à 27 pour la fabrication d'un médicament.

37. Utilisation selon la revendication 36 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des hémopathies malignes, en particulier les syndromes myéloprolifératifs
10 comprenant la Polyglobulie de Vaquez, la thrombocythénie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive.

38. Utilisation selon la revendication 36 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des syndromes myéloprolifératifs associées à la mutation JAK2 V617F, et
15 des autres hémopathies malignes et des tumeurs solides tels que des carcinomes, des mélanomes et des neuroblastomes, qui expriment JAK2 V617F.

39. Composition comprenant un siRNA selon l'une des revendications 25 à 27 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20

25

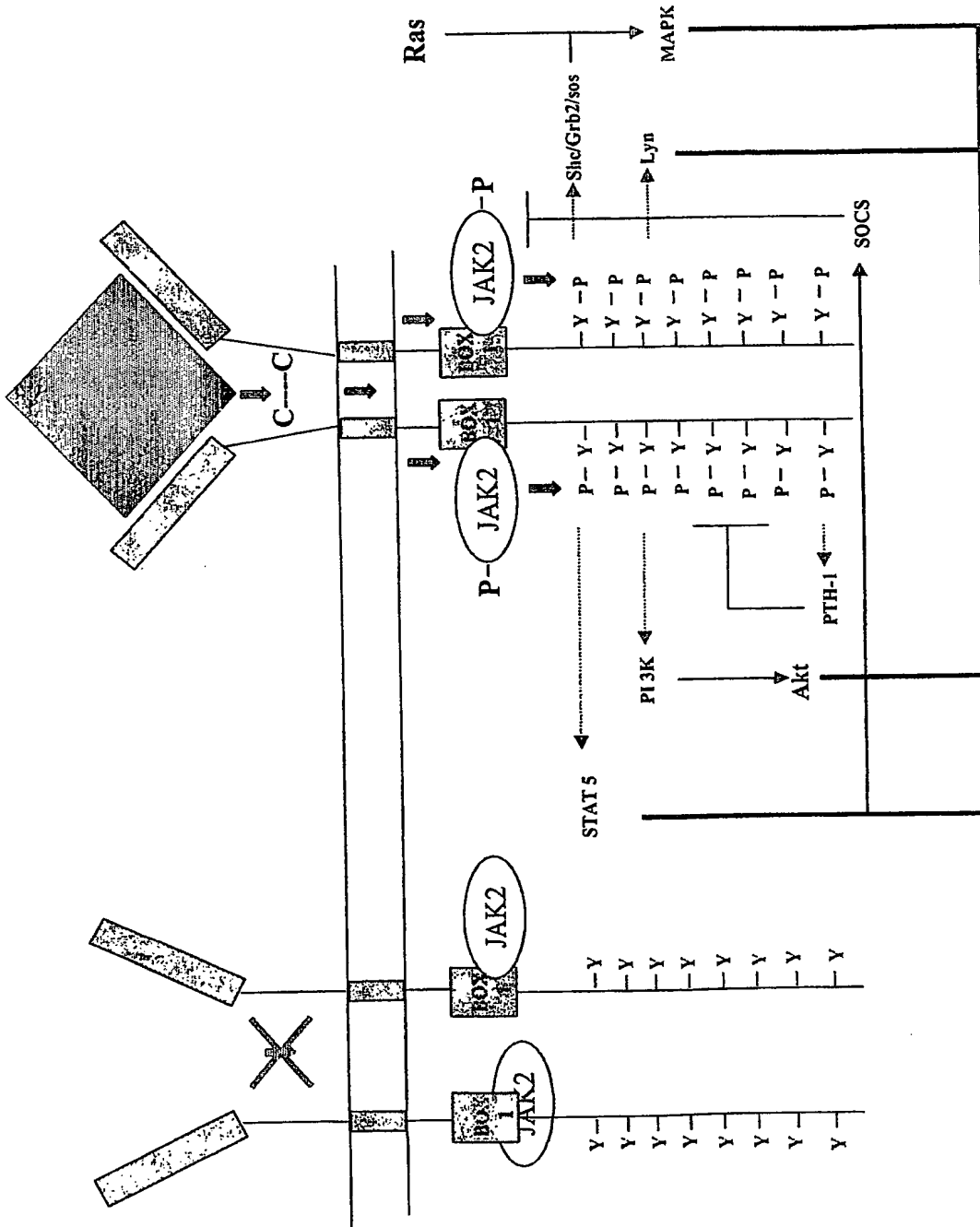


FIGURE 1

FIGURE 2B



SCF IL3

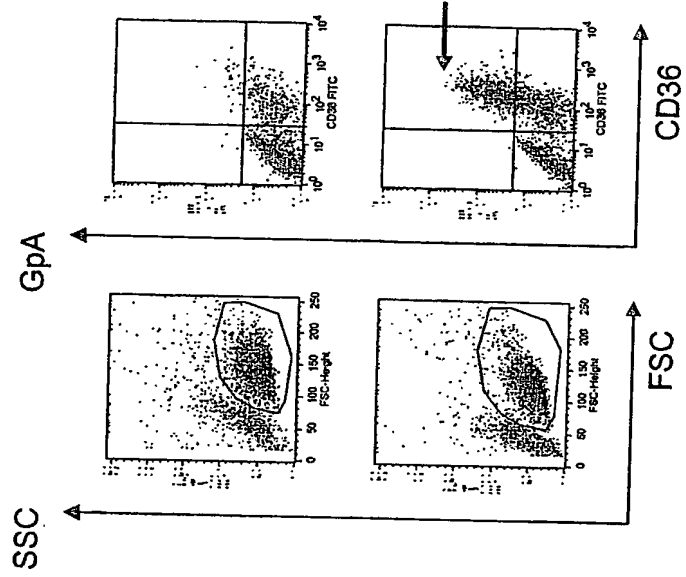
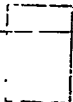
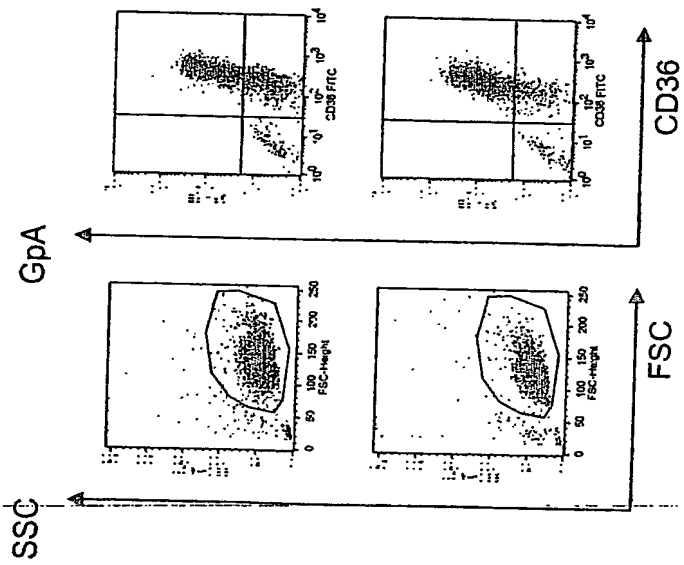


FIGURE 2A



SCF IL3 EPO



PATIENT PV

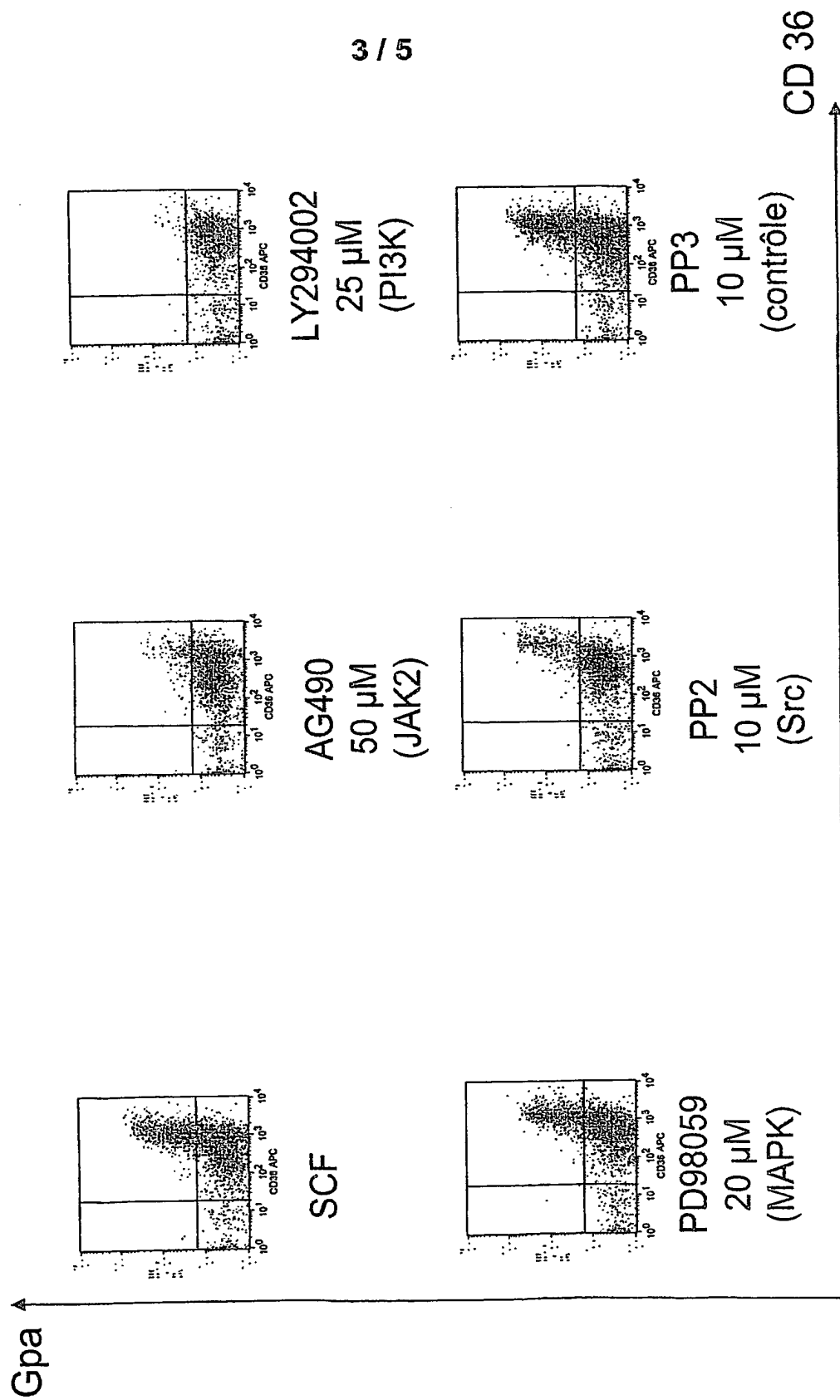


FIGURE 3

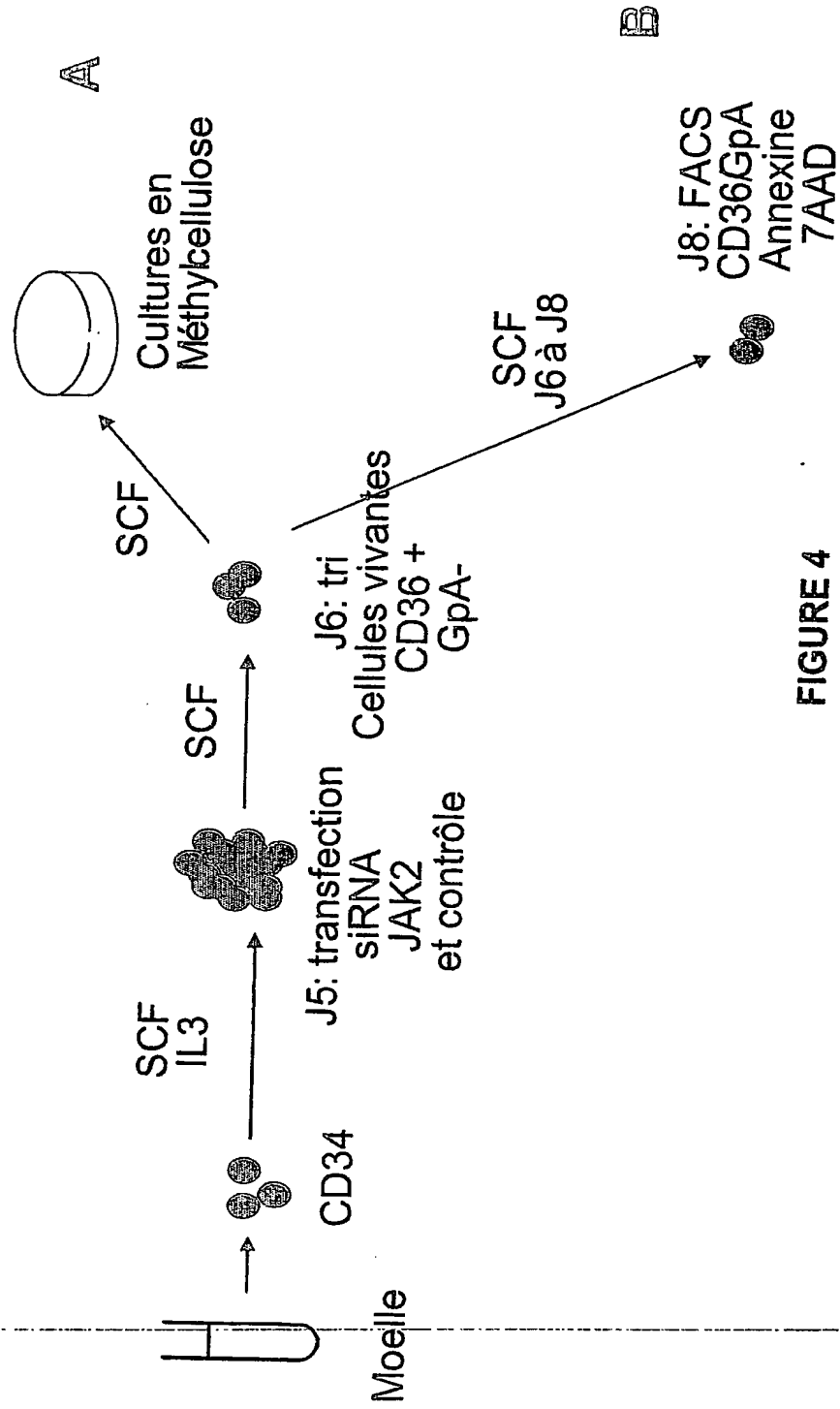


FIGURE 4

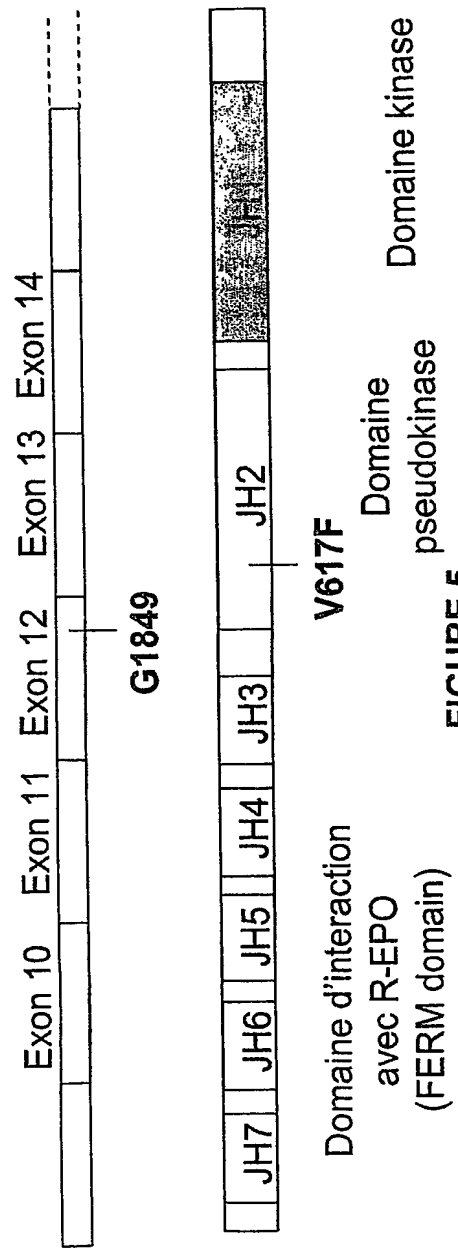
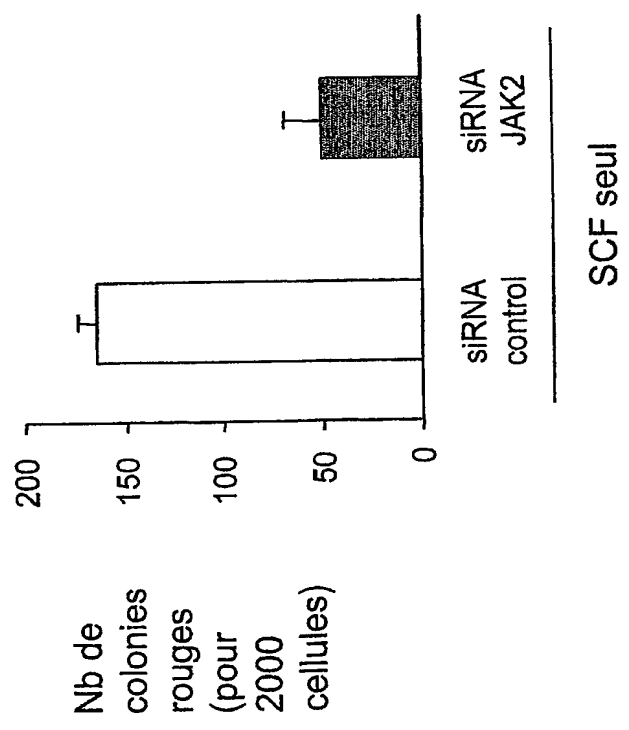


FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AH-HP)
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
Institut Gustave Roussy (IGR)
Université de Versailles - Saint-Quentin-en-Yvelines
Université Paris-Sud

<120> Identification d'une mutation de JAK2 impliquée dans le Polyglobulie de Vaquez

<130> D 22 707 / 241 699

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1132

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> variant JAK2 V617F.

<400> 1

Met	Gly	Met	Ala	Cys	Leu	Thr	Met	Thr	Glu	Met	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	1	5	10	15
Ser	Ser	Ile	Tyr	Gln	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	Gly	Asn	Ala	Asn	Ser	Met	20	25	30	
Lys	Gln	Ile	Asp	Pro	Val	Leu	Gln	Val	Tyr	Leu	Tyr	His	Ser	Leu	Gly	35	40	45	
Lys	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Leu	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Val	Ala	50	55	60	
Glu	Glu	Ile	Cys	Ile	Ala	Ala	Ser	Lys	Ala	Cys	Gly	Ile	Thr	Pro	Val	65	70	75	80
Tyr	His	Asn	Met	Phe	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Thr	Glu	Arg	Ile	Trp	Tyr	85	90	95	
Pro	Pro	Asn	His	Val	Phe	His	Ile	Asp	Glu	Ser	Thr	Arg	His	Asn	Val	100	105	110	
Leu	Tyr	Arg	Ile	Arg	Phe	Tyr	Phe	Pro	Arg	Trp	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	115	120	125	
Asn	Arg	Ala	Tyr	Arg	His	Gly	Ile	Ser	Arg	Gly	Ala	Glu	Ala	Pro	Leu	130	135	140	
Leu	Asp	Asp	Phe	Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Phe	Ala	Gln	Trp	Arg	His	Asp	145	150	155	160
Phe	Val	His	Gly	Trp	Ile	Lys	Val	Pro	Val	Thr	His	Glu	Thr	Gln	Glu	165	170	175	

Glu Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Asp Met Met Arg Ile Ala Lys Glu
 180 185 190
 Asn Asp Gln Thr Pro Leu Ala Ile Tyr Asn Ser Ile Ser Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Phe Leu Pro Lys Cys Ile Arg Ala Lys Ile Gln Asp Tyr His Ile Leu
 210 215 220
 Thr Arg Lys Arg Ile Arg Tyr Arg Phe Arg Arg Phe Ile Gln Gln Phe
 225 230 235 240
 Ser Gln Cys Lys Ala Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu Lys Tyr Leu Ile
 245 250 255
 Asn Leu Glu Thr Leu Gln Ser Ala Phe Tyr Thr Glu Lys Phe Glu Val
 260 265 270
 Lys Glu Pro Gly Ser Gly Pro Ser Gly Glu Glu Ile Phe Ala Thr Ile
 275 280 285
 Ile Ile Thr Gly Asn Gly Gly Ile Gln Trp Ser Arg Gly Lys His Lys
 290 295 300
 Glu Ser Glu Thr Leu Thr Glu Gln Asp Leu Gln Leu Tyr Cys Asp Phe
 305 310 315 320
 Pro Asn Ile Ile Asp Val Ser Ile Lys Gln Ala Asn Gln Glu Gly Ser
 325 330 335
 Asn Glu Ser Arg Val Val Thr Ile His Lys Gln Asp Gly Lys Asn Leu
 340 345 350
 Glu Ile Glu Leu Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu
 355 360 365
 Ile Asp Gly Tyr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys
 370 375 380
 Lys Glu Val Ala Pro Pro Ala Val Leu Glu Asn Ile Gln Ser Asn Cys
 385 390 395 400
 His Gly Pro Ile Ser Met Asp Phe Ala Ile Ser Lys Leu Lys Lys Ala
 405 410 415
 Gly Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Val Leu Arg Cys Ser Pro Lys Asp Phe
 420 425 430
 Asn Lys Tyr Phe Leu Thr Phe Ala Val Glu Arg Glu Asn Val Ile Glu
 435 440 445
 Tyr Lys His Cys Leu Ile Thr Lys Asn Glu Asn Glu Glu Tyr Asn Leu
 450 455 460
 Ser Gly Thr Lys Lys Asn Phe Ser Ser Leu Lys Asp Leu Leu Asn Cys
 465 470 475 480
 Tyr Gln Met Glu Thr Val Arg Ser Asp Asn Ile Ile Phe Gln Phe Thr
 485 490 495

Lys Cys Cys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Lys Ser Asn Leu Leu Val Phe
 500 505 510
 Arg Thr Asn Gly Val Ser Asp Val Pro Thr Ser Pro Thr Leu Gln Arg
 515 520 525
 Pro Thr His Met Asn Gln Met Val Phe His Lys Ile Arg Asn Glu Asp
 530 535 540
 Leu Ile Phe Asn Glu Ser Leu Gly Gln Gly Thr Phe Thr Lys Ile Phe
 545 550 555 560
 Lys Gly Val Arg Arg Glu Val Gly Asp Tyr Gly Gln Leu His Glu Thr
 565 570 575
 Glu Val Leu Leu Lys Val Leu Asp Lys Ala His Arg Asn Tyr Ser Glu
 580 585 590
 Ser Phe Phe Glu Ala Ala Ser Met Met Ser Lys Leu Ser His Lys His
 595 600 605
 Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu
 610 615 620
 Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly Ser Leu Asp Thr Tyr Leu Lys Lys
 625 630 635 640
 Asn Lys Asn Cys Ile Asn Ile Leu Trp Lys Leu Glu Val Ala Lys Gln
 645 650 655
 Leu Ala Trp Ala Met His Phe Leu Glu Glu Asn Thr Leu Ile His Gly
 660 665 670
 Asn Val Cys Ala Lys Asn Ile Leu Leu Ile Arg Glu Glu Asp Arg Lys
 675 680 685
 Thr Gly Asn Pro Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Ile Ser Ile
 690 695 700
 Thr Val Leu Pro Lys Asp Ile Leu Gln Glu Arg Ile Pro Trp Val Pro
 705 710 715 720
 Pro Glu Cys Ile Glu Asn Pro Lys Asn Leu Asn Leu Ala Thr Asp Lys
 725 730 735
 Trp Ser Phe Gly Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Ser Gly Gly Asp Lys
 740 745 750
 Pro Leu Ser Ala Leu Asp Ser Gln Arg Lys Leu Gln Phe Tyr Glu Asp
 755 760 765
 Arg His Gln Leu Pro Ala Pro Lys Trp Ala Glu Leu Ala Asn Leu Ile
 770 775 780
 Asn Asn Cys Met Asp Tyr Glu Pro Asp Phe Arg Pro Ser Phe Arg Ala
 785 790 795 800
 Ile Ile Arg Asp Leu Asn Ser Leu Phe Thr Pro Asp Tyr Glu Leu Leu
 805 810 815

Thr Glu Asn Asp Met Leu Pro Asn Met Arg Ile Gly Ala Leu Gly Phe
 820 825 830
 Ser Gly Ala Phe Glu Asp Arg Asp Pro Thr Gln Phe Glu Glu Arg His
 835 840 845
 Leu Lys Phe Leu Gln Gln Leu Gly Lys Gly Asn Phe Gly Ser Val Glu
 850 855 860
 Met Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Gln Asp Asn Thr Gly Glu Val Val Ala
 865 870 875 880
 Val Lys Lys Leu Gln His Ser Thr Glu Glu His Leu Arg Asp Phe Glu
 885 890 895
 Arg Glu Ile Glu Ile Leu Lys Ser Leu Gln His Asp Asn Ile Val Lys
 900 905 910
 Tyr Lys Gly Val Cys Tyr Ser Ala Gly Arg Arg Asn Leu Lys Leu Ile
 915 920 925
 Met Glu Tyr Leu Pro Tyr Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Gln Lys His
 930 935 940
 Lys Glu Arg Ile Asp His Ile Lys Leu Leu Gln Tyr Thr Ser Gln Ile
 945 950 955 960
 Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Thr Lys Arg Tyr Ile His Arg Asp
 965 970 975
 Leu Ala Thr Arg Asn Ile Leu Val Glu Asn Glu Asn Arg Val Lys Ile
 980 985 990
 Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr
 995 1000 1005
 Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro
 1010 1015 1020
 Glu Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp Val Trp
 1025 1030 1035
 Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu Lys
 1040 1045 1050
 Ser Lys Ser Pro Pro Ala Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp
 1055 1060 1065
 Lys Gln Gly Gln Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys
 1070 1075 1080
 Asn Asn Gly Arg Leu Pro Arg Pro Asp Gly Cys Pro Asp Glu Ile
 1085 1090 1095
 Tyr Met Ile Met Thr Glu Cys Trp Asn Asn Asn Val Asn Gln Arg
 1100 1105 1110
 Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ala Leu Arg Val Asp Gln Ile Arg Asp
 1115 1120 1125
 Asn Met Ala Gly

1130

<210> 2
<211> 5097
<212> ADN
<213> homo sapiens

<220>
<223> mutation G1849T dans le gène jak2.

<400> 2
ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc 60
tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgct tgggtgttcg cgtcgccact 120
tcggcttctc ggccggtcgg gccctcggc ccgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg 180
gctgctgcgg cgcagggaga ggcttggtcc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga 240
gcccacactg gagggccccc gagggcccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgcgc 300
cggggcttcg cagaccttga cccgccgggt aggagccgcc cctgcgggct cgagggcgcg 360
ctctggtcgc ccgatctgtg tagccggttt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa 420
ctgtttctct tctgcagaaa aagaggctct tctctctcct cccgcgacgg caaatgttct 480
gaaaaagact ctgcatggga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca 540
cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag 600
atccagttct tcagggtgat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga 660
cctttccatc tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg 720
gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaaacagaa aggatctggg 780
atccacccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa 840
taagatttta ctttcctcgt tggatttgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa 900
tatctcgagg tgctgaagct cctcttcttg atgactttgt catgtcttac ctctttgctc 960
agtggcggca tgattttgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg 1020
aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa 1080
cccactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttaccaaaa tgtattcgag 1140
caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtagaga tttcgcagat 1200
ttattcagca attcagccaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta 1260
taaactctga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaagta aaagaacctg 1320
gaagtgggcc ttcagggtgag gagatTTTTG caaccattat aataactgga aacggtggaa 1380
ttcagtgggc aagaggggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt 1440
tatattgcga ttttcctaatt attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggtt 1500

caaataaag	ccgagttgta	actatccata	agcaagatgg	taaaaatctg	gaaattgaac	1560
ttagctcatt	aaggaagct	ttgtctttcg	tgtcattaat	tgatggatat	tatagattaa	1620
ctgcagatgc	acatcattac	ctctgtaaag	aagtagcacc	tccagccgtg	cttgaaaata	1680
tacaaagcaa	ctgtcatggc	ccaatttcga	tggattttgc	cattagtaaa	ctgaagaaag	1740
caggtaatca	gactggactg	tatgtacttc	gatgcagtoc	taaggacttt	aataaatatt	1800
ttttgacttt	tgctgtcgag	cgagaaaatg	tcattgaata	taaacactgt	ttgattacaa	1860
aaaatgagaa	tgaagagtac	aacctcagtg	ggacaaagaa	gaacttcagc	agtcttaaag	1920
atcttttgaa	ttgttaccag	atggaaactg	ttcgctcaga	caatataatt	ttccagttta	1980
ctaaatgctg	tcccccaaag	ccaaaagata	aatcaaacct	tctagtcttc	agaacgaatg	2040
gtgtttctga	tgtaccaacc	tcaccaacat	tacagaggcc	tactcatatg	aaccaaagtg	2100
tgtttcacaa	aatcagaaat	gaagatttga	tatttaaatga	aagccttggc	caaggcactt	2160
ttacaaagat	ttttaaaggc	gtacgaagag	aagtaggaga	ctacgggtcaa	ctgcatgaaa	2220
cagaagttct	tttaaaagtt	ctggataaag	cacacagaaa	ctattcagag	tctttctttg	2280
aagcagcaag	tatgatgagc	aagctttctc	acaagcattt	ggttttaaat	tatggagtat	2340
gtttctgtgg	agacgagaat	attctgggtc	aggagtttgt	aaaatttgga	tcactagata	2400
catatctgaa	aaagaataaa	aattgtataa	atatattatg	gaaacttgaa	gttgctaaac	2460
agttggcatg	ggccatgcat	tttctagaag	aaaacacct	tattcatggg	aatgtatgtg	2520
ccaaaaatat	tctgcttctc	agagaagaag	acaggaagac	aggaaatcct	cctttcatca	2580
aacttagtga	tcttggcatt	agtattacag	ttttgccaaa	ggacattctt	caggagagaa	2640
taccatgggt	accacctgaa	tgcattgaaa	atcctaaaaa	tttaaatttg	gcaacagaca	2700
aatggagttt	tggtagcact	ttgtgggaaa	tctgcagtgg	aggagataaa	cctctaagtg	2760
ctctggattc	tcaaagaaaag	ctacaatttt	atgaagatag	gcatcagctt	cctgcaccaa	2820
agtgggcaga	attagcaaac	cttataaata	attgtatgga	ttatgaacca	gatttcaggc	2880
cttcttttcag	agccatcata	cgagatctta	acagtttggt	tactccagat	tatgaactat	2940
taacagaaaa	tgacatgtta	ccaaatatga	ggatagggtg	cctagggttt	tctggtgcct	3000
ttgaagaccg	ggatcctaca	cagtttgaag	agagacattt	gaaatttcta	cagcaacttg	3060
gcaagggtaa	ttttgggagt	gtggagatgt	gccggtatga	ccctctacag	gacaacactg	3120
gggaggtggg	cgctgtaaaa	aagcttcagc	atagtactga	agagcaccta	agagactttg	3180
aaagggaaat	tgaatccctg	aaatccctac	agcatgacaa	cattgtaaaag	tacaaggagag	3240
tgtgctacag	tgctggtcgg	cgtaatctaa	aattaattat	ggaatattta	ccatatggaa	3300

gtttacgaga ctatcttcaa aaacataaag aacggataga tcacataaaa cttctgcagt 3360
 acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atcttggtag aaaaaggat atccacaggg 3420
 atctggcaac gagaaatata ttggtggaga acgagaacag agttaaaatt ggagattttg 3480
 ggtaacca agtcttgcca caagacaaag aatactataa agtaaaagaa cctggtgaaa 3540
 gtcccatatt ctggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagttttct gtggcctcag 3600
 atgtttggag ctttggagtg gttctgtatg aacttttcac atacattgag aagagtaaaa 3660
 gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaaggacag atgatcgtgt 3720
 tccatttgat agaacttttg aagaataatg gaagattacc aagaccagat ggatgccag 3780
 atgagatcta tatgatcatg acagaatgct ggaacaataa tgtaaataca cgcctcct 3840
 ttagggatct agctcttcga gtggatcaaa taagggataa catggctgga tgaaagaaat 3900
 gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgctg 3960
 tggactatta ttacatatat cattattata taaatcatga tgctagccag caaagatgtg 4020
 aaaatatctg ctcaaaaactt tcaaagttta gtaagttttt cttcatgagg ccaccagtaa 4080
 aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgtaaga agtttcttaa acattgtctg 4140
 ttaacatcac tcttgtctgg caaaagaaaa aaaatagact ttttcaactc agctttttga 4200
 gacctgaaaa aattattatg taaattttgc aatgttaaag atgcacagaa tatgtatgta 4260
 tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatgtt ttacacacat 4320
 gagggctggt gttcattaat actgttttct aatttttcca tagttaatct ataattaatt 4380
 acttcactat acaaacaaat taagatgttc agataattga ataagtacct ttgtgtcctt 4440
 gttcatttat atcgctggcc agcattataa gcagggtgat acttttagct ttagattcca 4500
 tgtactgtaa atatttttca cataaaggga acaaatgtct agttttattt gtataggaaa 4560
 tttccctgac cctaaataat acattttgaa atgaaacaag cttacaaaga tataatctat 4620
 tttattatgg tttcccttgt atctatttgt ggtgaatgtg ttttttaa at ggaactatct 4680
 ccaaattttt ctaagactac tatgaadagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc 4740
 caggaatatt gtcaccttt gagctgctga ctgccaataa cattcttcga tctctgggat 4800
 ttatgctcat gaactaaatt taagcttaag ccataaaata gattagattg ttttttaaaa 4860
 atggatagct cattaagaag tgcagcaggt taagaatttt ttcctaaaga ctgtatattt 4920
 gaggggtttc agaattttgc attgcagtca tagaagagat ttatttcctt tttagagggg 4980
 aatgaggta aataagtaaa aaagtatgct tgtaattttt attcaagaat gccagtagaa 5040
 aattcataac gtgtatcttt aagaaaaatg agcatatc ttaaattctt tcaatta 5097

<210> 3
 <211> 554
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<220>
 <223> fragment de la SEQ ID No 2 avec la mutation G1849T.

<400> 3
 ctcatatgaa ccaaattggtg tttcacaaaa tcagaaatga agatttgata tttaaatgaaa 60
 gccttggcca aggcactttt acaaagattt ttaaaggcgt acgaagagaa gtaggagact 120
 acggtcaact gcatgaaaca gaagttcttt taaaagttct ggataaagca cacagaaact 180
 attcagagtc tttctttgaa gcagcaagta tgatgagcaa gctttctcac aagcatttgg 240
 ttttaaatta tggagtatgt ttctgtggag acgagaatat tctggttcag gagtttgtaa 300
 aatttggatc actagataca tatctgaaaa agaataaaaa ttgtataaat atattatgga 360
 aacttgaagt tgctaaacag ttggcatggg ccatgcattt tctagaagaa aacaccctta 420
 ttcatgggaa tgtatgtgcc aaaaatatct tgcttatcag agaagaagac aggaagacag 480
 gaaatcctcc tttcatcaaa cttagtgatc ctggcattag tattacagtt ttgccaaagg 540
 acattcttca ggag 554

<210> 4
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<220>
 <223> fragment de la SEQ ID No 3 avec la mutation G1849T.

<400> 4
 gatgagcaag ctttctcaca agcatttggg tttaaattat ggagtatggt tctgtggaga 60
 cgagaatatt ctggttcagg agtttgtaaa attt 94

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle.

<220>
 <223> AMORCE DE PCR (54804-54823).

<400> 5
 gggtttcttc agaacgttga 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> AMORCE DE PCR (55240-55260).

<400> 6

ttgctttcct ttttcacaag a

21

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> AMORCE DE SEQUENÇAGE (54813-54832).

<400> 7

cagaacgttg atggcagttg

20

<210> 8

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> AMORCE DE SEQUENÇAGE (55207-55233).

<400> 8

tgaatagtcc tacagtgttt tcagt

27

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> AMORCE DE PCR ET SEQUENÇAGE (1386-1407).

<400> 9

caacctcagt gggacaaaga a

21

<210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> AMORCE DE PCR ET SEQUENÇAGE (2019-2041).

<400> 10

gcagaatatt tttggcacat aca

23

<210> 11

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle.

<220>

<223> SONDAS SNPS ET DETECTION DE MUTATION ET siARN (1829-1870).

<400> 11

ttttaaatta tggagtatgt gtctgtggag acgagaatat tc

42

<210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<223> Séquence comprenant la mutation G1849T.

<400> 12

tatggagtat gtttctgtgg aga

23

<210> 13

<211> 21

<212> ARN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n est T

<220>

<223> siARN sens

<400> 13

uggaguaugu uucuguggan n

21

<210> 14

<211> 21

<212> ARN

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n est T

<220>

<223> siARN antisens.

<400> 14

uccacagaaa cauacuccan n

21



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

reçue le 19/11/04

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1 ... 2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 210103



Vos références pour ce dossier (facultatif)

241699 D22707 NT

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

04 11 480

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Identification d'une mutation de JAK2 impliquée dans la Polyglobulie de Vaquez

LE(S) DEMANDEUR(S) :

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS 3, avenue Victoria, 75004 PARIS FRANCE

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS France

INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY : 39, rue Camille Desmoulins 94800 VILLEJUIF FRANCE

UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES : 23 rue du Refuge, 78035 VERSAILLES France

UNIVERSITE PARIS-SUD, Bâtiment 300, 15 rue Georges Clémenceau, 91400 ORSAY FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom

Prénoms

VAINCHENKER William

Adresse

Rue

7 rue Geoffroy St Hilaire

Code postal et ville

75005 PARIS FRANCE

Société d'appartenance (facultatif)

2 Nom

Prénoms

UGO Valérie

Adresse

Rue

166 Avenue Ledru Rollin

Code postal et ville

75011 PARIS FRANCE

Société d'appartenance (facultatif)

3 Nom

Prénoms

JAMES Chloé

Adresse

Rue

3 rue Hippolyte Mulin

Code postal et ville

92120 MONTROUGE FRANCE

Société d'appartenance (facultatif)

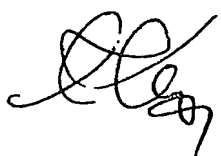
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

 92-1234
Christian TEXIER



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

☎ 08 85 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 2 ... 2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 4 W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		241699 D22707 NT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		06111680
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Identification d'une mutation de JAK2 impliquée dans la Polyglobulie de Vaquez		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS 3, avenue Victoria, 75004 PARIS FRANCE INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS France INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY : 39, rue Camille Desmoulins 94800 VILLEJUIF FRANCE UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES : 23 rue du Refuge, 78035 VERSAILLES France UNIVERSITE PARIS-SUD, Bâtiment 300, 15 rue Georges Clémenceau, 91400 ORSAY FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		LE COUEDIC Jean-Pierre
Adresse	Rue	18 allée Paul Eluard
	Code postal et ville	77420 CHAMPS SUR MARNE FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		CASADEVALL Nicole
Adresse	Rue	65 rue du Javelot
	Code postal et ville	75013 PARIS FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 92-1234 Christian TEAVER		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP2005/055586

International filing date: 26 October 2005 (26.10.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0411480
Filing date: 27 October 2004 (27.10.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 11 January 2006 (11.01.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.